

GENETIK UND BIOSYNTHESE
EINES SELENOCYSTEIN ENTHALTENDEN
POLYPEPTIDS:
FORMIATDEHYDROGENASE
AUS ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON
FRANZ ZINONI
AUS MÜNCHEN

JUNI 1987



GENETIK UND BIOSYNTHESE
EINES SELENOCYSTEIN ENTHALTENDEN
POLYPEPTIDS:
FORMIATDEHYDROGENASE
AUS ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON
FRANZ ZINONI
AUS MÜNCHEN

JUNI 1987

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
 2. Gutachter: Prof. Dr. R.G. Herrmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.1987

A B K Ü R Z U N G E N

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CGSC	Coli Genetic Stock Center
ColE1	Colicin E1
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
RF-DNA	doppelsträngige replikative Form von Phagen-DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
IPTG	Isopropylthio-B-D-Galactosid
IgG	Immunglobulin G
IS	Insertionselement
kb	Kilobasenpaar
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NC	Nitrocellulose
OD ₄₂₀	"optische Dichte" = Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm
ONPG	o-Nitrophenol-B-D-Galactosid
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger RNA
tRNA	transfer RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abkürzungen für Antibiotika

Ap	Ampicillin, ^r : resistent
Cm	Chloramphenicol
Km	Kanamycin
Rp	Rifampicin
Tc	Tetracyclin

Abkürzungen für Restriktionsenzyme

A	AatII	N	NsiI
Av	AvaI	Nc	NcoI
B	BglI	Nd	NdeI
Ba	BamHI	P	PvuI
Bc	BclI	Ps	PstI
Bg	BglI	S	SalI
Bs	BstEII	Sa	SacI
E	EcoRI	Sc	ScaI
EV	EcoRV	Sm	SmaI
H	HindIII	Sp	SphI
K	KpnI	Su	SauI
M	MluI	X	XbaI

. I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	12
1. Verwendete Organismen und Plasmide	12
2. Medien und Puffer	16
3. Wachstum von Bakterien	18
4. Vermehrung von Bakteriophagen	19
5. Genetische Methoden	20
a) Transfer genetischer Marker	20
b) Test genetischer Marker	20
c) Transposonmutagenese mit Tn10 und "Kurieren" des Transposons	21
d) Bestimmung der Transkriptionsrichtung eines Gens auf dem Chromosom	21
6. Molekulargenetische Methoden	22
a) Isolierung von DNA	22
1. Isolierung chromosomaler DNA	22
2. Isolierung von Plasmid-DNA	23
3. Isolierung von Phagen-DNA	23
4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose- gelen	24
5. Isolierung von Oligonucleotiden aus Harn- stoff-Polyacrylamidgelen	24
b) Klonierung von DNA-Fragmenten	25
1. Enzymatische <u>in vitro</u> Reaktionen mit DNA	25
2. Transformation und Transfektion mit DNA	25
c) <u>In vitro</u> Markierung von DNA-Fragmenten mit ³² P	26
1. nick translation	26
2. 5'- bzw. 3'-Endmarkierung von DNA-Fragmenten	26
3. 5'-Endmarkierung von Oligonucleotiden	26

d) Hybridisierungsexperimente	27
1. Transfer von DNA auf NC-Filter	27
2. Hybridisierung mit "Southern blots"	27
3. Koloniehybridisierung	28
4. Plaquehybridisierung	28
e) DNA-Sequenzierung	28
1. Enzymatische Methode	28
2. Chemische Methode	29
f) Lokalisierte Mutagenese mit Oligonucleotiden	29
1. "single priming Methode"	29
2. "gapped duplex Methode"	29
7. Elektrophoresetechniken	29
a) Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	29
b) Elektrophorese von Oligonucleotiden in Harnstoff-Polyacrylamidgelen	30
c) Sequenzgele	30
d) Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	30
8. <u>In vivo</u> Markierung von Selenoproteinen mit ⁷⁵ Se	30
9. Expression plasmidkodierter Proteine	31
a) Maxizelllexperiment	31
b) T7 RNA Polymerase/Promotor System	32
10. Immunoblot-Experiment	33
11. Enzymtest für β -Galactosidase	34
12. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen	34
ERGEBNISSE	35
1. Genetische Charakterisierung des chromosomalen <u>fdhF</u> Gens	35
a) Kartierung durch P1 Transduktion	35
b) Bestimmung der Transkriptionsrichtung von <u>fdhF</u>	39
2. Klonierung von <u>fdhF</u>	42
a) Analyse der Selenoproteine in <u>fdhF</u> -Mutanten	42
b) Klonierungsstrategie und Stammkonstruktionen	42
c) "Shotgun" Klonierung von <u>fdhF</u>	44

d) Komplementationsanalyse durch Subklonierung	47
e) Bestimmung der Orientierung von <u>fdhF</u> auf dem klonierten DNA-Segment	50
f) Konstruktion von Plasmiden mit terminalen Deletionen im <u>fdhF</u> Gen	53
3. Bestimmung der DNA-Sequenz von <u>fdhF</u>	56
4. Analyse der Selenopolypeptide in Plasmidklonen mit Deletionen im <u>fdhF</u> Gen	62
5. Rückhybridisierung der klonierten DNA-Segmente mit chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	68
a) Wildtyp	68
b) Mutante mit Mu-Insertion in <u>fdhF</u>	70
c) Mutante mit Deletion von <u>fdhF</u>	72
6. Reklonierung von <u>fdhF</u> mittels DNA-Hybridisierung und erneute Sequenzierung der DNA-Fragmente	75
a) Klonierung	75
b) Sequenzierung	76
7. Expressionsanalyse des plasmidkodierten <u>fdhF</u> Gens	77
a) Maxizellen	77
b) T7 RNA Polymerase/Promotor System	80
c) Expression unter Kontrolle des <u>lac</u> Promotors	86
8. Konstruktion von <u>fdhF-lacZ</u> Genfusionen und Analyse der Fusionsproteine	90
a) Plasmidkonstruktionen	90
b) Analyse des Seleneinbaus in Fusionsproteine	92
c) Immunologische Analyse	94
9. Untersuchungen zum Einfluß pleiotroper <u>fdh</u> , <u>chl</u> und <u>trpI</u> Mutationen auf die Expression von <u>fdhF</u>	98
a) Mutationen in <u>fdhA</u> und <u>fdhB</u>	98
b) Mutationen in <u>chlA</u> und <u>chlB</u>	100
c) Mutation in <u>trpI</u>	101
10. Untersuchungen zur Spezifität des Seleneinbaus	104
a) Seleneinbau in der Mutante HY15	104
b) Transduktionsanalyse der Mutante HY15	104

11. Lokalisierte Mutagenese im <u>fdhF</u> Gen mit Hilfe von Oligonucleotiden	107
a) Austausch des Codons UGA gegen UGC	107
b) Austausch des Codons UGA gegen UGU bzw. UCA	111
c) Analyse des Selineinbaus in die Genprodukte der mutierten <u>fdhF</u> Gene	113
d) Untersuchungen zum Einfluß von <u>fdhA</u> auf die Expression von <u>fdhF</u> *- <u>lacZ</u> Fusionen	115
12. Expression und Selenierung von <u>fdhF</u> - <u>lacZ</u> Fusionsproteinen in <i>Salmonella typhimurium</i>	118
DISKUSSION	123
ZUSAMMENFASSUNG	139
LITERATUR	141

E I N L E I T U N G

Das Spurenelement Selen, seit langer Zeit als Gift bekannt, wurde erst 1957 als essentiell für den menschlichen und tierischen Stoffwechsel erkannt (152). Selenarm ernährte Ratten entwickelten innerhalb weniger Wochen tödliche Lebernekrosen, die sich durch selenhaltige Futterzusätze vollständig verhindern ließen. Die dabei verabreichten Selenmengen waren außerordentlich gering und bewegten sich im Mikrogrammbereich.

In der Folge wurde auch die "Weißmuskelkrankheit" bei Lämmern und Ziegen, sowie die "exudative Diathese" bei Hühnern als Selenmangelkrankheit erkannt (150, 162). Die in einigen Provinzen Chinas auftretende "Keshan-Krankheit", eine schwere degenerative Veränderung des Herzmuskels, ist ebenfalls auf Selenmangel zurückzuführen. Darüber hinaus besteht ein enger Zusammenhang zwischen Selenmangel und rheumatisch-arthritischen Syndromen, Störungen der Fortpflanzungsfähigkeit, Schwächung der Immunkompetenz und bestimmten degenerativen Augenerkrankungen (150).

Andererseits sind auch Beispiele für die Giftigkeit von Selen für den tierischen und menschlichen Organismus gut dokumentiert. Zu den bekanntesten Beispielen gehören die "Alkali-Krankheit" und die Erscheinung der "blind staggers" bei Rindern. Organische Selenverbindungen werden in Pflanzen akkumuliert, die auf selenreichen Böden wachsen, und gelangen als Bestandteil des Futters in den Tierorganismus (162). Die biochemischen Ursachen der Toxizität von Selenverbindungen sind jedoch im Detail nur wenig bekannt (154). Die positiven und negativen Wirkungen

des Selen im Säugetierorganismus liegen also nah beieinander; der physiologische Konzentrationsbereich ist relativ schmal und beträgt nur zwei Zehnerpotenzen (150).

Der Antagonismus von Selen und Schwefel im Zellstoffwechsel

Mikroorganismen bieten gegenüber so komplexen biologischen Systemen wie z.B. Säugetieren wegen ihrer einfachen Wuchsstoffbedürfnisse und Anzuchtbedingungen Vorteile, wenn es um physiologische und biochemische Untersuchungen zur Rolle von Selen im Stoffwechsel geht. Viele dieser Experimente wurden deshalb an Bakterien wie *Escherichia coli* durchgeführt.

Schwefel kann im Stoffwechsel von *E. coli* nur zum Teil durch Selen ersetzt werden. Methioninbedürftige Mutanten, mit Selenomethionin und Sulfat supplementiert, können exponentiell wachsen und inkorporieren Selenomethionin unspezifisch in Zellprotein (41). Werden die Mutanten hingegen mit Methionin und Selenit (anstelle von Sulfat) kultiviert, kommt das Wachstum nach der Erschöpfung des zellendogenen Schwefels zum Stillstand (41, 173). In dieser Phase nehmen die Zellen zwar verstärkt Selenit auf, es ist aber keine Neusynthese aktiver Enzyme nachzuweisen (41, 174).

Selenomethionin scheint aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Methionin für *E. coli* relativ ungiftig zu sein. In β -Galactosidase sind 70 - 75 % der Methioninreste durch das Selenoanalog ersetzbar, ohne daß sich die katalytischen Parameter des Enzyms ändern (36). Enzyme mit Methionin bzw. Selenomethionin im katalytischen Zentrum sind jedoch nicht näher untersucht.

Keiner der Cysteinreste dieser Seleno- β -Galactosidase war jedoch andererseits durch Selenocystein ersetzt worden (81). Darüber hinaus konnte bislang generell der unspezifische Einbau von Selenocystein in Proteine nicht überzeugend nachgewiesen werden (162, 174). Als experimentelle Schwierigkeit mag dazu beitragen, daß Selenocystein bei der sauren Hydrolyse von Proteinen (zur Aminosäureanalyse) völlig zersetzt wird (80) und deshalb nicht nachgewiesen werden kann. Man ist deshalb dazu übergegangen, durch Carboxymethylierung der reduzierten Selenolgruppen der Eliminierung von Selen vorzubeugen und Selenocystein als entsprechendes Derivat nachzuweisen (39).

Aus biochemischer Sicht wäre ein Austausch von Cystein gegen sein Selenoanalog in Proteinen sehr interessant. Vergleicht man nämlich Cystein und Selenocystein bezüglich ihrer chemischen Eigenschaften, fällt die deutlich höhere Reaktivität der Selenolgruppe gegenüber der Sulfhydrylgruppe auf. Die Selenolgruppe liegt bei physiologischem pH dissoziiert vor, die Sulfhydrylgruppe dagegen undissoziiert (80, 154). Es wäre also zu erwarten, daß die Substitution von Cystein durch Selenocystein die katalytischen Eigenschaften einer Reihe von Enzymen verändert.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die biochemische Ursache der unspezifischen Substitution von Schwefel- durch Selenverbindungen im Stoffwechsel vermutlich in der mangelnden Unterscheidungsfähigkeit der Enzyme liegt, die an der Umsetzung dieser Substrate beteiligt sind. Bekannte Beispiele sind die Enzyme ATP-Sulfurylase, Cysteinyl- und Methionyl-tRNA-Synthetase und S-Adenosylmethionin-Synthetase (162).



Selen als essentieller Bestandteil im Zellstoffwechsel

Auch die Frage, ob es Komponenten der Zelle gibt, die auf Selen als essentiellen Cofaktor angewiesen sind, um ihre Aktivität entfalten zu können, wurde intensiv untersucht.

Ausgangspunkt dafür waren Studien von Pinsent (1954) sowie von Enoch, Lester und DeMoss (54, 100). Sie konnten zeigen, daß *E. coli* nur dann aktive Formiatdehydrogenase (FDH) bildet, wenn im Medium ausreichend Selenit, Molybdat und Eisen zur Verfügung stehen. Die optimalen Konzentrationen für die Spurenelemente liegen bei 0.1 - 1 μ M.

In der Folge wurden aus einer ganzen Palette von Organismen selenhaltige Proteine und Ribonucleinsäuren isoliert. In den Arbeiten wurde radioaktives ^{75}Se -Selenit zur Markierung eingesetzt. Es stellte sich dabei heraus, daß Selen, wenn es in physiologisch niedrigen Konzentrationen supplementiert wird, von den Zellen hochspezifisch in ganz wenige Selenoenzyme und Seleno-tRNAs inkorporiert wird und in diesen Molekülen in Form bestimmter Komponenten vorliegt.

Selenierte tRNAs in *E. coli* wurden als Lysin- und Glutamat-akzeptierende Spezies identifiziert (182). Beide tRNAs enthalten das Selenonucleosid 5-Methylamino-methyl-2-seleno-Uridin ($\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$) (184). Berichte über das Vorkommen von 4-Seleno-Uridin (78) beruhen wahrscheinlich auf einem Artefakt (184). Wie in vitro Versuche andeuten, entsteht $\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ in einem ATP-abhängigen Prozeß aus dem schwefelhaltigen Vorläufer $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$. Dieser Prozeß wird auch nicht durch Schwefelkonzentrationen im Medium beeinflusst, die 10 000-fach über denen von Selen liegen. Vielmehr existiert intrazellulär ein Gleichgewicht zwischen $\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ und $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ in tRNA^{Lys} und tRNA^{Glu} , das praktisch konstant gehalten wird (183).

$\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ wurde auch als Bestandteil von tRNA^{Glu} in *Clostridium sticklandii* und *Methanococcus vannielii* identifiziert (184). Beide Organismen besitzen noch weitere Selenonucleoside, deren Struktur aber erst teilweise bekannt ist (26). tRNA^{Glu} in *Cl. sticklandii* kann anscheinend nur dann aminoacyliert werden, wenn sie $\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ enthält (25). Das Selenonucleosid kommt in dieser tRNA an der sogenannten "wobble position" (43) im Anticodon vor und wird mit einer verbesserten Erkennung des Glutamatcodons GAG in Zusammenhang gebracht (24). In anderen Untersuchungen wurden selenierte tRNAs auch in Leukämie-Zelllinien der Maus nachgewiesen (23). *Bacillus subtilis* scheint keine selenierten tRNAs zu besitzen (184).

Die zweite große Gruppe selenhaltiger Biomoleküle sind die Selenoproteine. Sie wurden vor allem aus verschiedenen Bakterien isoliert und charakterisiert. Aus Säugetieren wurde in erster Linie Glutathionperoxidase gereinigt und untersucht. Diesem Enzym wird auch von medizinischer Seite großes Interesse entgegengebracht.

Glutathionperoxidase, das erste als Selenoprotein identifizierte Enzym (59), ist unter Säugetieren allgemein verbreitet. Es schützt die Zellmembran vor allem in Erythrocyten und Leberzellen vor Schäden, indem es organische Peroxide beseitigt, die infolge der Oxidation ungesättigter Membranlipide entstehen (58). In Patienten mit Selenmangelsyndromen werden abnorm geringe Glutathionperoxidase-Aktivitäten festgestellt (150, 154, 163). Das Enzym ist ein Tetramer aus identischen Polypeptiden (MG 17 000 - 23 000) und enthält pro Untereinheit einen Selenocysteinrest kovalent gebunden als Teil der Aminosäurekette (60). Die Selenocysteinreste sind an der Katalyse beteiligt, die Selenolgruppen unterliegen im Reaktionszyklus des Enzyms einem Valenzwechsel ("redox shuttle") (93). Als Co-Substrat und Reduktionsmittel dient Glutathion.

Die Aminosäuresequenzen der gereinigten Enzyme aus Ratte (38) und Rind (70) sind teilweise oder ganz aufgeklärt. Das Strukturgen der Glutathionperoxidase der Maus wurde aus Genbanken genomischer DNA und cDNA isoliert und sequenziert (21). Dabei zeigte sich eine große Homologie zwischen den Glutathionperoxidasen verschiedener Herkunft. Aufgrund von in vitro Studien wurde von Hawkes und Tappel (1983) ein co-translatiöner Einbaumodus für Selenocystein vorgeschlagen. Eine entsprechende tRNA konnte aber noch nicht isoliert werden.

In Clostridien wurden verschiedene Selenoenzyme gefunden (163); eines der bekanntesten Beispiele ist die Glycinreduktase aus *Cl. sticklandii* (39). Das Enzym ist an der reduktiven Desaminierung von Glycin beteiligt und enthält neben zwei anderen Untereinheiten auch ein Selenopolypeptid von 12 000 Da. In diesem Protein liegt Selen in Form von Selenocystein als Teil der Polypeptidkette vor (39). Die Proteinsequenz ist jedoch bislang nicht aufgeklärt. Die hohe Empfindlichkeit des Proteins gegenüber Sauerstoff wird auch auf die extreme Labilität der ionisierten Selenolgruppe am Selenocystein zurückgeführt (163). Die Synthese des Selenoproteins ist von der Supplementierung der Zellen mit Selenit abhängig. In selendefizienten Zellen kann es immunologisch nicht nachgewiesen werden (163).

In purinvergärenden Clostridien wurde neben Glycinreduktase noch ein anderes Selenoprotein, die Xanthin-Dehydrogenase, gefunden. In Rekonstitutionsversuchen ergab sich, daß das Enzym Selen wahrscheinlich in Form einer Selenoketoverbindung, nicht aber als Selenocystein enthält. Auch in Nikotinsäure-Dehydrogenase, die in *Cl. barkeri* nachgewiesen wurde, handelt es sich bei der Selenkomponente nicht um Selenocystein (53, 163).

Selenabhängige Formiatdehydrogenasen (FDH) wurden in verschiedenen Clostridien sowie in *M. vannielii* und *E. coli* entdeckt (163). Selenocystein wurde bislang jedoch erst in den Enzymen aus *M. vannielii* und *C. sticklandii* nachgewiesen (80).

Physiologische und biochemische Eigenschaften der Formiatdehydrogenasen von *E. coli*

E. coli besitzt zwei verschiedene Formiatdehydrogenasen. Beide Enzyme sind Komponenten des anaeroben Stoffwechsels, lassen sich aber verschiedenen metabolischen Wegen zuordnen.

FDH_N ist an der Nitratreduktion beteiligt und bildet mit Nitratreduktase einen membrangebundenen Komplex (137, 138). Die bei der Spaltung von Formiat freiwerdenden Elektronen dienen zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Als Elektronencarrier wurden neben enzymgebundenen Cytochrom b-Komponenten in beiden Enzymen auch Ubichinon und Menachinon identifiziert (137, 177). FDH_N ist wahrscheinlich auch an der anaeroben Nitritreduktion und Fumaratrespiration beteiligt (1, 84). Vermutlich ist sie auch ein Bestandteil der (aeroben) Formiatoxidase (135, 172). Das Enzym wurde von Enoch und Lester (1975) gereinigt und charakterisiert. Es besteht aus drei Untereinheiten mit 110 kDa, 32 kDa und 20 kDa in der Zusammensetzung $\alpha_4\beta_4\gamma_{2-4}$. Das 110 kDa Protein ist ein Selenopolypeptid, darüber hinaus enthält das Enzym einen Molybdäncofaktor und Eisen-Schwefel-Zentren. Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden Phenazinmethosulfat (PMS) und Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als Elektronenakzeptoren verwendet (55).

FDH_H andererseits ist an der Spaltung von Formiat in Wasserstoff (H₂) und Kohlendioxid beteiligt. Sie bildet mit einer Hydrogenase und Elektronenüberträger(n) den Formiat-

Hydrogenlyase (FHL) Komplex (127). Die Elektronencarrier sind nicht identifiziert. Cytochrom c_{552} , ursprünglich als FHL-Komponente vermutet (37), ist an der Nitritreduktion beteiligt (1, 49). Chinone (177) und Flavine (127) können ebenfalls ausgeschlossen werden (136). FDH_H konnte aufgrund ihrer Labilität nicht gereinigt werden, ihre genaue Untereinheitenstruktur ist deswegen unbekannt. Das Enzym enthält ebenfalls ein Selenopolypeptid, das aber eine Größe von 80 kDa besitzt (42) und sich auch immunologisch von der 110 kDa Untereinheit der FDH_N unterscheidet (64). Darüber hinaus enthält FDH_H auch Molybdän (100). FDH_H reduziert im Enzymtest nur Benzylviologen und kann daran von FDH_N unterschieden werden (55, 127). Über die zelluläre Lokalisation existieren widersprüchliche Angaben. Das Enzym wurde je nach Art der Präparation zu verschiedenen Anteilen in cytoplasmatischen und in Membranfraktionen nachgewiesen (64, 68, 136).

Bezüglich ihres Regulationsmusters unterscheiden sich FDH_N und FDH_H deutlich voneinander. FDH_N -Synthese ist aerob reprimiert und anaerob durch Nitrat induziert (37, 135); es ist anaerob aber auch in Abwesenheit von Nitrat basale Expression feststellbar (64, 135). Wie bei vielen anderen Enzymen anaerober Respirationssysteme wie Fumarat- und Nitratreduktase wird auch Synthese von FDH_N positiv durch das fnr Genprodukt reguliert (G. Sawers, unveröffentlicht).

FDH_H hingegen wird nur unter Gärungsbedingungen, also anaerob in Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren gebildet, und durch Zugabe von Formiat noch zusätzlich induziert (11, 37, 68, 126, 130, 135). Die Stärke der Repression korreliert mit dem Redoxpotential der verschiedenen Elektronenakzeptoren Sauerstoff, Nitrat und Fumarat (126). Von Cole und Wimpenny (179, 180) wurde das Modell der Redoxkontrolle vorgeschlagen, in dem ein redoxsensitiver Regulator die Expression der unterschiedlichen Enzymsysteme kontrolliert. Dieses Regulationsmuster könnte

aber auch durch ein System entsprechender Repressor- und Induktorproteine zustande kommen (122, 164). Darüber hinaus ist die Expression von FDH_H indirekt auch von fnr abhängig (17), da fnr vermutlich die Synthese von Pyruvatformiatlyase reguliert, die ihrerseits den Induktor Formiat liefert (145).

Genetik der Formiatdehydrogenasen

Genetische Untersuchungen zu Formiatdehydrogenasen wurden praktisch ausschließlich an *Salmonella typhimurium* und *E. coli* durchgeführt.

Es wurde eine große Vielfalt an FDH-negativen Mutanten isoliert und mit genetischen Mitteln charakterisiert. Bis auf wenige Ausnahmen war aber eine Zuordnung der betroffenen Gene und ihrer Produkte nicht möglich; das beruht wohl zum Teil auf der extremen Sauerstoffempfindlichkeit der Formiatdehydrogenasen und den daraus resultierenden experimentellen Problemen.

Es existiert eine Reihe an Mutanten, in denen pleiotrope Defekte zum Ausfall beider FDH-Aktivitäten führen. So kommt es in chl Mutanten (chlA - G) (65) durch Defekte im Molybdän-Stoffwechsel zum Ausfall aller Molybdoenzyme; neben den Formiatdehydrogenasen sind auch Nitrat-, Nitrit-, TMAO- und DMSO-Reduktasen betroffen (16, 65, 72, 84, 103, 112). Die entsprechenden chl Genprodukte sind nur zum Teil biochemisch bekannt (112).

In den pleiotropen fdh Mutanten fehlen ebenfalls beide FDH-Aktivitäten, andere Molybdoenzyme werden aber in normalen Mengen gebildet (10, 27, 28, 138). In *E. coli* wurden vier Gene, fdhA - D, identifiziert (66, 72, 105), über deren Genprodukte aber bisher nichts bekannt ist. Es wäre jedoch denkbar, daß sie in Analogie zu den Chl-Proteinen am Einbau von Selen in die beiden Formiat-

dehydrogenasen beteiligt sind. Es ist unwahrscheinlich, daß es sich bei diesen Genen um FDH-Strukturgene handelt, da keinerlei immunologische Kreuzreaktion zwischen FDH_N und FDH_H gefunden wurde (64).

Auch Mutanten, in denen nur die FDH_N -Aktivität ausfällt, konnten isoliert werden. Die betroffenen Genloci wurden mit fdhE (*E. coli*) bzw. mit fdn (*S. typhimurium*) bezeichnet. Das (die) fdhE Genprodukt(e) sind nicht bekannt (72), es könnte sich bei fdhE aber um ein Operon mit den Strukturgenen der FDH_N -Proteine handeln. fdn Mutanten bilden kein FDH_N -assoziiertes Cytochrom b_{559} (12).

FDH_H -negative Mutanten können in zwei Klassen eingeteilt werden. In einer Klasse sind diejenigen, in denen Mutationen indirekt zum Ausfall der FDH_H führen, wie pfl, ana und hyd (123, 125, 175). pfl und ana Mutanten bilden kein Formiat und können deshalb FDH_H nicht induzieren. Fast alle pleiotropen hyd Mutanten (178, 185) sind auch in der FDH_H -Aktivität betroffen, dieser Phänotyp ist bisher jedoch nicht verstanden.

Die Vertreter der anderen Klasse FDH_H -negativer Stämme haben Mutationen in den Genen fdhF (*E. coli*), fhl (*S. typhimurium*) und fdv (*E. coli*). Die Genprodukte von fdv (97, 144) und fhl (11) sind unbekannt, fdhF ist das Strukturgen für das Selenopolypeptid der FDH_H (125).

Mechanismus des Seleneinbaus in die Selenoproteine der Formiatdehydrogenasen

Es gibt bislang keine Information darüber, wie in *E. coli* der Einbau von Selen in die Selenopolypeptide der FDH_N und FDH_H erfolgt. Man weiß nur, daß es sich um einen hochspezifischen Mechanismus handeln muß, da von den etwa 3000 Proteinen in *E. coli* nur zwei seleniert werden.

Vermutlich ist Selenocystein die selenhaltige Komponente in diesen Proteinen. Es kommt also hinzu, daß diese Aminosäure eine ganz bestimmte Position in den Polypeptidketten einnehmen muß, damit die Aktivität der Enzyme gewährleistet ist. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Mechanismen des Seleneinbaus vorstellbar. Zum einen ist eine post-translationale Modifikation des selenfreien Apoproteins möglich, bei der eine bestimmte Aminosäure in Selenocystein umgewandelt oder gegen Selenocystein ausgetauscht wird. Zum anderen ist ein co-translationaler Einbau von Selenocystein denkbar. In diesem Fall stellt sich die Frage, ob es ein bestimmtes Codon oder einen Codoncontext gibt, der das Signal für den Einbau von Selenocystein gibt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das Strukturgen des 80 kDa Selenoproteins der FDH_H (fdhF) zu klonieren und seine Sequenz aufzuklären, um eine Basis für Untersuchungen zum Einbau der Selenkomponente in das Protein zu schaffen.

In diesen Untersuchungen wurde im fdhF Strukturgen ein UGA (Stopp) Codon gefunden, das mit dem Seleneinbau in engem Zusammenhang steht. Die Resultate dieser Arbeit weisen einen co-translationalen Einbau von Selenocystein an einer bestimmten Aminosäureposition der wachsenden Polypeptidkette nach.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Verwendete Organismen und Plasmide

Genotyp und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt. Die Genbezeichnungen entsprechen dem Nomenklaturstandard (4). In Tabelle 3 sind die verwendeten E. coli-spezifischen Bakteriophagen aufgelistet. Die verschiedenen Plasmidvektoren und rekombinanten Plasmide, die entweder zur Konstruktion von anderen Plasmiden oder zu Komplementationsversuchen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, finden sich in Tabelle 4. Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind im Teil "Ergebnisse" ausführlich dargestellt.

Tabelle 1: Stämme von E. coli K-12

Stamm	Genotyp	Referenz
AB1157	F ⁻ thi-1 thr-1 leuB6 proA2 his-4 argE3 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 λ ⁻	(3)
BMH71-18	F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^Q ZΔ M15/Δ (pro-lac) thi supE	(90)
BMH71-18mutS	BMH71-18, mutS215::Tn10	(90)
BW113	Hfr metB1 relA1 λ ⁻	(101)
CDJ64	F ⁻ Δ (pro-lac) thi gyrA rpoB sup-9 (trpT) Val ^r λ ⁺	(114)

Stamm	Genotyp	Referenz
DH1	F ⁻ thi-1 hsdR17 recA1 endA1 relA1 supE44 λ ⁻	(73)
FD03	Hfr metB1 relA1 fdhA λ ⁺	(66)
FD07	Hfr metB1 relA1 fdhB λ ⁺	(66)
FM1	PR11, gyrA	A
FM2	AB1157, gyrA (Mu c ⁺)	A
FM72	JRG780, mel::Tn10 frdA ⁺	A
FM150	HY15, mel::Tn10	A
FM151	HY15, mel::Tn10 fdhF ⁺	A
FM412	MC4100, (λ cI857 Sam7)/λ	A
FM420	MC4100, srl::Δ Tn10 recA56	A
FM440	MC4100, ilvC7 metE163::Tn10	A
FM443	MC4100, sup-9 metE163::Tn10	A
FM445	MC4100, Δ fdhA metE163::Tn10	A
FM446	MC4100, Δ fdhA metE163::Tn10 sup-9	A
FM900	MC4100, fdhF::Mu dI(Ap ^r lac)* / F'ts114 lac ⁺ zzzf-20::Tn10	A
FM909	MC4100, Δ fdhF	(125)
FM911	MC4100, Δ fdhF srl::Δ Tn10 recA56	A
FM931	MC4100, Δ fdhF mel::Tn10	A
FM932	MC4100, Δ fdhF mel::Tn10	A
FM1200	F ⁻ Δ (pro-lac) thi supE endA sbcB rpsL	A
FM1216	FM1200, Δ fdhF mel::Δ Tn10	A
FM1222	FM1200, fdhF::Mu dI(Ap ^r lac)* srl::Δ Tn10 recA56	A
FM1226	FM1200, Δ fdhF mel::Δ Tn10 / F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔ M15	A
FM2620	RW262, mel ⁺	A
FM2625	RW262, mel ⁺ fdhF15	A
FM2626	RW262, fdhF::Mu dI(Ap ^r lac)*	A
G11a1	HfrC ilv-299 metB1 ampA1 relA1 λ ⁺	(56)
Hfr3300	HfrH thi-1 lacI22 relA1 λ ⁻	(3)
HY15	F ⁻ proC23 trp-30 his-51 lac-28 fdhF15 rpsL101 λ ⁺	(186)

Stamm	Genotyp	Referenz
JC10240	Hfr thr-300 ilv-318 thi-1 srl-300::Tn10 recA56 relA1 spoT1 rpsE300 λ^-	(45)
JM101	F' traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15/ Δ (pro-lac) thi supE	(189)
JRG780	F ⁻ trpA9761 trpR72 gal-25 frdA11 rpsL195 λ^-	(95)
K38	HfrC phoA4 pit-10 tonA22 ompF627 relA1 λ^+	(102)
MC4100	F ⁻ araD139 Δ (argF-lac)U169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 λ^-	(20)
M9s	MC4100, fdhF::Mu dI(Ap ^r lac)*	(126)
MK30-3	F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15/ Δ (pro-lac) thi galE gyrA recA rpsL	(90)
NK5336	sup(UGA), andere Marker unbekannt	N.Kleckner
PR11	F ⁻ leuB6 purE42 trpE38 his-208 argG77 aroE353 ilvA681 metA160 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 azi-6 rpsL109 rpsE13 tonA23 tsx-67 supE44 λ^-	(82)
RK4349	F ⁻ pro-3 his-218 ilvC7 metE163::Tn10 metB1 Δ (lacZY)6 xyl-5 entA403 rpsL109 supE44 λ^-	CGSC6403
RK4353	MC4100, gyrA non	(164)
RK5200	MC4100, gyrA non chlA200::Mu cts	(164)
RK5208	MC4100, gryA non chlB207::Mu cts	(164)
RW262	F ⁺ mel-1 tonA supF58 λ^-	(151)
WA321	AB1157, dam-4	(50)
WL30153	MC4100, Δ fdhA	W.Leinfelder
WL31153	MC4100, Δ fdhA Δ (srl-recA)306::Tn10	W.Leinfelder

A: diese Arbeit

*: temperaturinsensitiv, Wachstum bei 43°C

Tabelle 2: Stämme von *S. typhimurium* LT2

Stamm	Genotyp	Referenz
CC4412recA	proC90 hsd _{LT} 33 hsd _{SA} 20 srl::Tn5 recA1 rpsL	(149)
TL117	Δ (proAB)47	(44)
TT627	F'ts114 lac ⁺ zzf-20::Tn10/pyrC7 rpsL1	(31)

Tabelle 3: Verwendete Bakteriophagenstämme

Phage	Genotyp	Referenz
P1kc	c	(99)
λ NK370	b221 cI857 cI171::Tn10 O(UGA)261	N.Kleckner
λ Y47	cI857 Sam7	(143)
M13mp9	Iam IIam lac'IP0Z' α	(111)
M13mp19	lac'IP0Z' α	(118, 189)

Tabelle 4: Verwendete Plasmidvektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp/Phänotyp	Referenz
pACYC184	4.0	Cm ^r Tc ^r	(22)
pBR322	4.4	Ap ^r Tc ^r	(18)
pBR328	4.9	Ap ^r Tc ^r Cm ^r	(160)
pGA22	7.8	Ap ^r Tc ^r Cm ^r Km ^r	(2)
pGA44	12.5	Cm ^r Tc ^r Rp ^r	(2)

pGP1-2	7.2	Km ^r T7 Gen 1	(171)
pLC25-33		ColE ^{imm} me1A ⁺ B ⁺	(117, 173)
pMC874	9.2	Km ^r lac'ZYA	(19)
pMC1403	9.9	Ap ^r lac'ZYA	(19)
pT7-4	2.4	Ap ^r T7 Ø10	S. Tabor
pT7-6	2.2	Ap ^r T7 Ø10	S. Tabor
pUC9	2.7	Ap ^r lac'IPOZ' α	(176)
pUC18	2.7	Ap ^r lac'IPOZ' α	(118, 189)
pUC19	2.7	Ap ^r lac'IPOZ' α	(118, 189)

2. Medien und Puffer

Die folgenden Medien wurden verwendet:

Vollmedien:

LB	(113)	1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl.
TGYES		LB + 0.5 % Glucose.
TGYEP	(13)	1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % Glucose, 1.2 % K ₂ HPO ₄ , 0.3 % KH ₂ PO ₄ ; pH 6.5 - 6.7.
YM	(158)	1 % Trypton, 0.5 % NaCl, 0.01 % Hefeextrakt, 0.2 % Maltose.

Minimalmedien:

WM	(61)	100 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM MgSO ₄ , 0.1 mM CaCl ₂ , 12 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 µM Na ₂ SeO ₃ , 10 µM Na ₂ MoO ₄ ; pH 6.5.
----	------	---

SF (schwefelfreies WM)

100 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂,
0.1 mM CaCl₂, 12 mM NH₄Cl, 10 µM Na₂SeO₃,
10 µM Na₂MoO₄; pH 6.5.

Pro Liter Minimalmedium wurde 1 ml folgender Spurenelementlösung zugegeben (116):

400 μM H_3BO_3 , 30 μM CoCl_2 , 10 μM CuSO_4 ,
10 μM ZnSO_4 , 80 μM MnCl_2 , 10 mM FeCl_3

Feste Nährböden:

Zur Herstellung von Nährböden wurde den Nährlösungen 1.5 % Agar zugesetzt. Zur Herstellung von Weichagar wurde eine Konzentration von 0.65 % Agar verwendet.

MacConkey Indikatoragar: 40 g Difco Fertigagar + 10 g C-Quelle auf 1 l deionisiertes Wasser

Supplemente wurden nach dem Autoklavieren steril in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Aminosäuren 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Nucleinbasen 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Vitamin B 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

"Aromix":

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan je 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
p-OH-Benzoesäure, p-NH₂-Benzoesäure und Shikimi-
säure je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mu dl-lysogene Stämme)

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (plasmidhaltige Stämme)

Chloramphenicol 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Nalidixinsäure 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Rifampicin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Streptomycin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tetracyclin 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Folgende Standard-Puffer wurden verwendet (106):

TBE

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
pH 8.3	

TAE

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM
pH 7.8	

SSC

NaCl	150 mM
Na-Citrat	15 mM
pH 7.2	

SSPE

NaCl	150 mM
NaH ₂ PO ₄	10 mM
EDTA	1 mM
pH 7.4	

TE

Tris-Cl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8.0	

Denhardt's Lösung

Rinderserumalbumin	0.02 %
Ficoll	0.02 %
Polyvinylpyrrolidon	0.02 %

3. Wachstum von Bakterien

Kleinanzuchten wurden in New Brunswick Wasserbadschüttlern (Modell G76) bei einer definierten Temperatur (30°C bzw. 37°C) durchgeführt. Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte verfolgt, die im Photometer bei 420 bzw. 600 nm bestimmt wurde.

Die aerobe Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte unter starkem Schütteln in Erlenmeyerkolben, die zu einem Zehntel ihres Nennvolumens mit Medium gefüllt waren. Die anaerobe Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte unter langsamer Bewegung in Serumflaschen mit beliebigem Füllungsgrad unter 100 % N₂-Atmosphäre mit 0.5 bar Überdruck.

Aerobes Wachstum auf Nährböden erfolgte in temperaturkonstanten Brutschränken. Für anaerobes Wachstum wurden die Bakterien in gasdichten Stahlzylindern unter 100 % Stickstoff mit 0.5 bar Überdruck bebrütet.

4. Vermehrung von Bakteriophagen

P1: Plattenlysate wurden nach den Angaben von Miller (1972) hergestellt. Das Medium war LB + 5 mM CaCl.

λ: Anzucht und Titerung erfolgten nach beschriebenen Methoden (158). Als Indikatorstamm zur Anzucht und Titerung von λNK370 diente NK5336 (sup (UGA)). Zur Großanzucht von λY47, dessen DNA als Längenstandard in Agarosegelen verwendet wurde, diente der Stamm FM412. Dieser Stamm wurde folgendermaßen konstruiert: MC4100 wurde zuerst mit λY47 lysogenisiert (147). Einer der lysogenen und damit temperatursensitiven Klone (FM410) wurde im zweiten Schritt benutzt, um λ-resistente Abkömmlinge zu erhalten (147). Einer dieser Stämme war FM412.

Die Großanzucht von λY47 wurde nach Maniatis et al. (1982) durchgeführt. Die Phagen wurden durch Zentrifugation über CsCl-Blockgradienten gereinigt (46).

M13: Anzucht und Titerung der Phagen erfolgten nach beschriebenen Methoden (91, 109). M13mp9 und seine Derivate wurden auf Stämmen mit supE Suppressor vermehrt.

5. Genetische Methoden

a) Transfer genetischer Marker

Konjugationen wurden nach der Beschreibung von Miller (1972) in Flüssigmedium durchgeführt.

Transduktionen mit dem Phagen Pl_{kc} erfolgten nach den Angaben von Miller (1972).

Beim Transfer von Antibiotika-Resistenzmarkern wurde den Zellen 1 bis 2 Stunden Zeit für die phänotypische Expression gelassen.

b) Test genetischer Marker

fdh Je nach der Zahl der Klone wurde entweder mittels Durhamröhrchen (52) auf Bildung von Gas aus Glucose (TGYES-Medium) getestet oder es wurde mittels Überschichtungstest (105) die Reduktion von Benzylviologen geprüft.

mel Die Selektion auf mel⁺ erfolgte auf WM-Agar mit 0.4 % Melibiose bei 30°C. Die Melibiosepermease von E. coli K-12 ist bei höheren Temperaturen nicht aktiv (132).

frd Die Selektion auf frdA⁺ erfolgte anaerob auf WM-Agar mit 0.8 % Glycerin und 40 mM Na-Fumarat. Zur Verbesserung des Wachstums wurden 0.05 % Casaminoaciden zugesetzt.

trpT Geeignete Verdünnungen von λ NK370 wurden zu je 10 μ l auf einen Rasen von 10^8 Zellen des jeweiligen Stammes getropft. Auf Stämmen mit trpT (sup-9) Suppressor plattierte λ NK370 normal, auf suppressorfreien Stämmen sank die Rate auf 10^{-4} bis 10^{-5} .

c) Transposonmutagenese mit Tn10 und "Kurieren" des Transposons

Die Transposonmutagenese erfolgte nach den Angaben von N. Kleckner (unveröffentlicht).

Die Bakterien wurden in YM-Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezogen, geerntet und in 10 mM MgSO_4 resuspendiert. 5×10^{10} Zellen wurden in 6 ml MgSO_4 mit 1.5×10^{10} Phagen (λ NK370) infiziert und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde dann auf Agar mit Tetracyclin und Na-pyrophosphat (2.5 mM) ausplattiert und 48 Stunden bei 30°C bebrütet.

Klone, die sekundär ihre Tn10-Insertionen verloren hatten und wieder Tc-sensitiv geworden waren, wurden nach der Methode von Maloy und Nunn (104) isoliert.

d) Bestimmung der Transkriptionsrichtung eines Gens auf dem Chromosom

Es wurde dabei mit Modifikationen nach der Methode von Chumley et al. (1979) vorgegangen.

Im ersten Schritt erfolgte der Transfer von F'ts114 aus *S. typhimurium* TT627 in *E. coli* M9s. Die Konjugation erfolgte bei 30°C. Exkonjuganten wurden auf WM Glucose Agar mit Tetracyclin selektiert und anschließend gereinigt. Einer dieser Klone war FM900.

Ausgehend von FM900 wurden Hfr-Derivate isoliert. Aus drei Einzelkolonien von FM900 wurden separate Kulturen in LB-Medium mit Tetracyclin angeimpft und bei 43°C bis zur Sättigung angezogen. Geeignete Verdünnungen dieser Kulturen wurden auf MacConkey Lactose Agar mit Tetracyclin plattiert und über Nacht bei 43°C bebrütet. Praktisch alle Kolonien

waren Lac-positiv. Je eine Kolonie aus diesen Ausstrichen wurde als Hfr-Donor für den unterbrochenen Chromosomentransfer verwendet.

6. Molekulargenetische Methoden

a) Isolierung von DNA

1. Isolierung chromosomaler DNA

Die verwendete Prozedur beruht auf bereits beschriebenen Methoden (107, 139) und wurde mit Abwandlungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* und *S. typhimurium* angewandt. Da die Zellen von *S. typhimurium* ungleich schwieriger aufzubrechen waren, wurde die Lyseprozedur entsprechend verändert (Dr. H. Schmieger, pers. Mitteilung).

E. coli Zellen wurden in LB angezogen und in der stationären Phase geerntet. Nach dem Waschen in TE-Puffer wurden 0.5 g Zellen (Naßgewicht) in 10 ml TE resuspendiert. Sie wurden bei 37°C 15 min mit 5 mg Lysozym behandelt und dann nach Zugabe von 1 % SDS durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Nach Behandlung mit 1 mg Proteinase K (60 min, 37°C) klarte das Lysat ganz auf.

S. typhimurium Zellen wurden in analoger Weise angezogen, geerntet und gewaschen. 0.5 g Zellen (Naßgewicht) wurden in 5 ml SET-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 7.6, 50 mM EDTA, 20 % Saccharose) resuspendiert, eingefroren und wieder aufgetaut. Dann wurden sie mit 8 mg Lysozym behandelt (30 min, 37°C) und mit 2 mg Proteinase K in 2 % SDS (90 min, 37°C) aufgebrochen, wobei das Lysat ganz klar wurde.

Anschließend wurde die DNA (in einem Volumen von 10 ml) dreimal mit Phenol (106) und zweimal mit Chloroform extrahiert. Sie wurde aus 0.3 M Na-Acetat mit Äthanol präzipitiert und in 5 ml TE-Puffer gelöst. Kontaminierende RNA wurde durch Behandlung mit 0.5 mg RNase aus Rinderpankreas (60 min, 37°C) abgebaut. Die DNA wurde jeweils einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und nochmals mit Äthanol aus 0.3 M Na-Acetat gefällt. Der Niederschlag wurde mit 70 % Äthanol gewaschen. Die DNA wurde in 1 - 2 ml TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

2. Isolierung von Plasmid-DNA

Schnellpräparationen aus Übernachtskulturen bis zu 5 ml wurden nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt (106). Ribosomale RNA und Verunreinigungen mit SDS wurden größtenteils durch Präzipitation mit 2 M LiCl entfernt (129).

Plasmidpräparationen im größeren Maßstab wurden nach der "cleared lysate" Methode (35, 92) durchgeführt. Die Amplifizierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Zugabe von Chloramphenicol (170 µg/ml) oder Spectinomycin (300 µg/ml) (34, 160). Die Abtrennung von Proteinen und RNA geschah durch zweimalige Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten in Anwesenheit von Ethidiumbromid (106). Nicht-methylierte Plasmid-DNA wurde aus dem dam-Methylase-negativen Stamm WA321 (dam-4) isoliert.

3. Isolierung von Phagen-DNA

Einzel- und doppelsträngige M13-DNA wurde nach den Angaben von Kramer und Fritz (1987) präpariert.

Die Präparation von λ -DNA erfolgte gemäß den Angaben von Wirth (181) aus Phagenpartikeln von λ Y47, die über CsCl-Blockgradienten gereinigt worden waren.

4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden je nach Verwendungszweck mit verschiedenen Methoden aus Agarose eluiert.

Bei Klonierungen wurde die DNA in den meisten Fällen durch Ausfrieren aus Agarosegelstücken gewonnen (14). In einigen anderen Fällen und generell für "nick translationen" wurden DNA-Fragmente auf DEAE-Cellulose-Membranen (Schleicher & Schüll, NA45) transferiert (51). Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der besseren Zugänglichkeit der DNA gegenüber Enzymen. Radioaktiv markierte DNA-Fragmente für Sequenzierungsexperimente wurden aus Gelen gewonnen, die aus Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt bestanden (106).

5. Isolierung von Oligonucleotiden aus Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Das oligonucleotidhaltige Gelstückchen wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Reaktionsgefäß mit 500 μ l sterilem Wasser versetzt und mit einem sterilen Glasstab kleingestoßen. Anschließend wurde das Gefäß über Nacht bei 65°C inkubiert. Das Acrylamid wurde abzentrifugiert und nochmals mit 300 μ l Wasser extrahiert (3 Stunden, 65°C). Die wässrigen Überstände wurden vereinigt und eingeeengt (lyophilisiert), um dann nacheinander mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert zu werden. Das Oligonucleotid wurde anschließend durch Zugabe von Äthanol aus 0.3 M Na-Acetat/0.01 $MgCl_2$ gefällt (über Nacht bei -20°C), mit 75 % Äthanol gewaschen und getrocknet. Das Oligo-

nucleotid wurde in TE gelöst, anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und auf 2 μ M eingestellt.

6. b) Klonierung von DNA-Fragmenten

1. Enzymatische in vitro Reaktionen mit DNA

Die Spaltung mit Restriktionsenzymen erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Puffern.

Das Auffüllen von überhängenen 5'-Enden an Restriktionsfragmenten erfolgte durch DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in Anwesenheit aller vier Desoxyribonucleosid-tri-phosphate (106).

Die Entfernung der 5'-ständigen terminalen Phosphatgruppen an DNA-Fragmenten erfolgte durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (106).

Zur Ligation wurden DNA-Fragmente mit T4 DNA-Ligase und 1 mM ATP 18 Stunden bei 12°C - 14°C inkubiert (106). Die Anheftung von synthetischen "Linker"-Molekülen an DNA-Fragmente erfolgte nach Phosphorylieren der Linker (106) ebenfalls mit T4 DNA-Ligase (106).

Die schrittweise Verkürzung von DNA-Fragmenten geschah mit der Exonuclease Bal31 (106). In Vorversuchen wurden die Bedingungen für die gewünschte Abbaurrate ermittelt.

2. Transformation und Transfektion mit DNA

Kompetente Zellen wurden nach der Beschreibung von Maniatis et al. (1982) (*E. coli*) oder nach der Methode von Lederberg und Cohen (1974) (*S. typhimurium*) mit Plasmid-DNA transformiert.

Die Transfektion kompetenter Zellen mit M13 DNA geschah nach Kramer et al. (1984).

6. c) In vitro Markierung von DNA-Fragmenten mit ^{32}P

1. nick translation

1 μg isoliertes DNA-Fragment wurde mit DNA-Polymerase I und 50 μCi α - ^{32}P -dATP (3 000 Ci/mmol) radioaktiv markiert (106). Nichteingebaute Nucleotide wurden über eine Sephadex G50 Minisäule abgetrennt.

2. 5'- bzw. 3'-Endmarkierung von DNA-Fragmenten

Markierungen an überhängenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten erfolgten nach Maniatis et al. (1982). Die Markierung der 5'-Enden erfolgte mit T4 Polynucleotidkinase und γ - ^{32}P -ATP (7 000 Ci/mmol). Die Markierung der 3'-Enden geschah mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und einem geeigneten α - ^{32}P -dNTP (3 000 Ci/mmol).

Markierungen an überhängenden 3'-Enden von DNA-Fragmenten wurden mit terminaler Desoxynucleotidyltransferase und α - ^{32}P -ddATP (3 000 Ci/mmol) durchgeführt (190).

3. 5'-Endmarkierung von Oligonucleotiden

Oligonucleotide wurden mit γ - ^{32}P -ATP (3 000 Ci/mmol) und T4 Polynucleotidkinase markiert. Das markierte Oligonucleotid wurde über eine Sephadex G25 Minisäule von nicht eingebauten radioaktiven Nucleotiden abgetrennt.

6. d) Hybridisierungsexperimente

1. Transfer von DNA auf NC-Filter

DNA in Agarosegelen wurde nach der Methode von Southern (1975) auf NC-Filter transferiert (BA85, Schleicher und Schüll).

E. coli Klone wurden im Rahmen einer Koloniehybridisierung auf NC-Filter (die auf LB-Agar lagen) überstempelt und bebrütet. Durch Transfer der Filter auf LB-Agar mit Chloramphenicol (170 µg/ml) wurde die Plasmid-DNA amplifiziert. Das weitere Vorgehen zur Lyse der Zellen und zur Bindung der freigesetzten DNA an die NC-Filter orientierte sich an den Angaben von Maniatis et al. (1982).

Der Transfer von Einzelstrang DNA aus M13 Plaques auf NC-Filter ("plaque lifting") wurde nach der Beschreibung für λ-Plaques durchgeführt (106).

2. Hybridisierung mit "Southern blots"

Die Prähybridisierung erfolgte in 6 x SSPE, 40 - 50 % Formamid und 0.7 % Magermilch (85). Die Konzentration an Formamid variierte mit der Art der Hybridisierung (homolog oder heterolog).

Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C im oben genannten Puffer. Nach der Hybridisierung wurde der NC-Filter bei Raumtemperatur je zweimal in 2 x SSPE, 0.1 % SDS, 0.5 % Magermilch bzw. in 0.2 x SSPE, 0.1 % SDS, 0.5 % Magermilch gewaschen.

Der Filter wurde nach dem Trocknen mit Röntgenfilm (XRay90) bei Raumtemperatur exponiert.

3. Koloniehybridisierung

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten bei 68°C in 6 x SSPE und 0.7 % Magermilch. Anschließend wurden die Filter dreimal je 30 min in 2 x SSPE, 0.1 % SDS, 0.5 % Magermilch gewaschen, getrocknet und bei Raumtemperatur mit Röntgenfilm exponiert.

4. Plaquehybridisierung

Die Filter wurden 10 min bei 42°C in 4 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung, 0.1 % SDS und 0.1 % Na-pyrophosphat prähybridisiert. Die Hybridisierung fand im selben Puffer bei 50°C statt. Als Sonden-DNA diente das radioaktiv markierte Oligonucleotid (0.5 µCi/ml). Die Filter wurden zuerst bei Raumtemperatur dreimal 2 min in 4 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen. Die nächsten Waschschrirte erfolgten bei 45°C, 51°C, 58°C und 64°C, wobei die Filter nach jedem Waschen mit Röntgenfilm und Verstärkerfolie (Agfa, Curix MR800) bei -70°C exponiert wurden.

6. e) DNA-Sequenzierung

1. Enzymatische Methode

Die Sequenzierung von M13 Einzelstrang-DNA orientierte sich an den Angaben von Bankier und Barrell (7). Das Anhybridisieren des 17mer-Primers (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') erfolgte 20 min bei 55°C. Die Sequenzreaktionen wurden bei erhöhter Temperatur (45°C) durchgeführt. Als radioaktives Nucleotid diente α -³⁵S-dATP (15).

2. Chemische Methode

DNA-Fragmente, deren 5'- bzw. 3'-Enden mit ^{32}P markiert waren, wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen nachgespalten. Die nur mehr an einem Ende markierten Spaltstücke wurden anschließend auf Gelen mit niedrigschmelzender Agarose aufgetrennt und eluiert. Die basenspezifischen Modifikationsreaktionen wurden mit Ausnahme der "A+G" Reaktion (67) nach den Angaben von Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt.

6. f) Lokalisierte Mutagenese mit Oligonucleotiden

1. "single priming Methode"

Die Mutagenese erfolgte nach den Angaben von Zoller und Smith (1983). Zirkulär geschlossene M13 DNA wurde nach der Synthese des zweiten Stranges ohne Anreicherung transfiziert.

2. "gapped duplex Methode"

Das Vorgehen lehnte sich eng an die Beschreibung von Kramer et al. (1984) an.

7. Elektrophoresetechniken

a) Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Gelen (106), die Konzentration der Agarose variierte entsprechend den Fragmentgrößen der DNA von 0.6 - 1.5 %. Als Laufpuffer diente TBE oder TAE Puffer. Als Längenstandard dienten geeignete DNA-Fragmente des Phagen λ Y47 (143) oder des Plasmids pBR322 (128, 170).

b) Elektrophorese von Oligonucleotiden in Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Die Acrylamidkonzentration betrug je nach Länge des Oligonucleotids 8 - 20 %. Um die Diffusion des Oligonucleotids aus der Gelmatrix zu erleichtern, wurde in präparativen Gelen das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 19:1 auf 29:1 erhöht.

c) Sequenzgele

Sequenzproben wurden auf 6 %, 8 % und 20 % Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 7 M Harnstoff aufgetrennt. Der Laufpuffer war in allen Fällen TBE. Thermostatisierbare Glasplatten (62) ermöglichten Gelläufe bei definierten Temperaturen und verhinderten wirksam Lauf-Verzerrungen ("smile").

d) Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Das Gelsystem entsprach den Angaben von Laemmli (1970). Neben Gelen mit uniformer Polyacrylamidkonzentration (6 %, 8 %) wurden auch solche mit einem linearen Konzentrationsgradienten (8 - 20 %) für Polyacrylamid benutzt. Die Probenpuffer enthielten 80 mM Tris-Cl pH 6.8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 10 % Glyzerin und 0.002 % Bromphenolblau (42). Die Proteinbanden wurden durch Färben mit Coomassie Blue R250 sichtbar gemacht.

8. In vivo Markierung von Selenoproteinen mit ^{75}Se

Die Markierung wurde mit Modifikationen nach Cox et al. (1981) durchgeführt.

Die Anzucht der Stämme erfolgte in TGYES-Medium (pH 6.8, mit 10 μM Na-Molybdat) unter N_2 -Atmosphäre. Das FDH_H -Selenoprotein wurde durch 30 mM Na-Formiat induziert, das FDH_N -Selenoprotein durch 50 mM Kaliumnitrat. Das radioaktive Na- ^{75}Se -Selenit besaß eine spezifische Aktivität von 433 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ und wurde in einer Endkonzentration von 2.4 μM zugegeben. Die Zellen wurden nach der Markierung in Probenpuffer (42) aufgebrochen. Um das FDH_N -Selenoprotein vor Proteolyse zu schützen, wurden die Zellen in Anwesenheit von 0.5 mM PMSF geerntet und aufgebrochen (125). Gesamtzellprotein wurde mit SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden nach dem Färben getrocknet und bei -70°C mit Röntgenfilm und Verstärkerfolie exponiert.

9. Expression plasmidkodierter Proteine

a) Maxizellexperiment

Das Vorgehen orientierte sich grundsätzlich an der Beschreibung von Sancar et al. (140, 141).

Stamm FM911, transformiert mit den entsprechenden Plasmiden, wurde anaerob bei 37°C in WM-Medium mit 0.8 % Glucose und 0.5 % Casaminosäuren bis zu einer OD_{420} von 1.0 angezogen. 10 ml Kultur wurden 60 sek in einer Glaspetrischale mit UV-Licht (254 nm, $300 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in lichtdicht verpackte Serumflaschen überführt, und die Atmosphäre wurde gegen N_2 ausgetauscht. Zwei Stunden später wurde Cycloserin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt, und es wurde über Nacht weiterinkubiert.

Die Zellen wurden gesammelt, zweimal in SF-Salzen gewaschen, in 5 ml SF-Salzen mit 0.8 % Glucose und 18 Aminosäuren (je 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, außer Cystein und Methionin)

resuspendiert und wieder unter N_2 -Atmosphäre gebracht. 30 min später wurde Na-Formiat (30 mM) zugegeben, wieder 30 min später wurde je 1 ml Kultur 2 Stunden bei 37°C mit 20 μCi ^{35}S -Methionin ($> 1\,000\text{ Ci/mmol}$) markiert. 5 min nach Zugabe von nicht-radioaktivem Methionin (200 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen geerntet und durch Kochen in Probenpuffer (42) aufgebrochen.

Die Proben wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden nach dem Färben mit "Amplify" (Amersham-Buchler, Braunschweig) behandelt und bei -70°C mit Röntgenfilm exponiert.

b) T7 RNA Polymerase/Promotor System

Die in vivo Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin erfolgte nach den Angaben von S. Tabor (unveröffentlicht).

Zellen mit pGP1-2 und einem der pT7-Plasmide wurden bei 28°C in LB mit Ampicillin und Kanamycin angezogen. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0.5 wurden 2 ml Kultur zentrifugiert, die Zellen wurden in 2 ml WM-Salzen gewaschen und in 10 ml WM-Medium mit 0.4 % Glucose und 18 Aminosäuren (je 100 $\mu\text{g/ml}$, außer Cystein und Methionin) resuspendiert. Die Kulture wurde 90 bis 120 min bei 28°C weiter inkubiert.

Anschließend wurde die Kultur zu je 1 ml in Reaktionsgefäße verteilt und 15 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von Rifampicin (200 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen noch 10 min bei 42°C belassen und dann auf 30°C gebracht. 20 min später wurde die Kultur für 5 min mit je 10 μCi ^{35}S -Methionin inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gesammelt, in 1 ml 0.9 % NaCl gewaschen und durch Kochen in Probenpuffer (42) lysiert.

Die Extrakte wurden in SDS-Gelen aufgetrennt und, wie bei Maxizellen beschrieben, für die Fluorographie vorbereitet.

Zur in vivo Markierung von Proteinen mit ^{75}Se -Selenit wurde etwas anders vorgegangen.

Die Kultur wurde bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin angezogen. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0.8 wurden die Zellen gesammelt und im gleichen Volumen LB ohne Antibiotika resuspendiert.

Anschließend wurde die Kultur zu je 1 ml in Reaktionsgefäße verteilt und 15 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von Rifampicin wurde sie noch 10 min bei 42°C belassen und dann auf 30°C gebracht. Nach 15 min bei 30°C erfolgte die Zugabe von 1 μCi ^{75}Se -Selenit. 60 bzw. 120 min später wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und durch Kochen in Probenpuffer (42) aufgebrochen.

Die Gelelektrophorese der Extrakte und die Autoradiographie erfolgten wie im Kapitel 8 beschrieben.

10. Immunoblot-Experiment

Die Methode von Howe und Hershey (79) wurde mit Modifikationen (148) übernommen.

Gesamtzellprotein wurde nach Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auf NC-Filter transferriert. Die Filter wurden zur Absättigung mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Die verwendeten Anti- β -Galactosidase-Antikörper lagen als IgG-Fraktion (30 mg/ml Protein) eines Schaf-Antiserums vor. Die Antikörper wurden 1:4 000 verdünnt und mit den Filtern über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Filter mit gegen Schafantikörper gerichteten Antikörpern aus Kaninchen

behandelt. Dazu wurden die Filter 3 Stunden mit einer 1:500 Verdünnung eines Anti-Schaf-IgG-Peroxidasekonjugats inkubiert. Anschließend wurden die Filter mehrmals gewaschen und 3 Stunden mit 2.5 μCi ^{125}J -markiertem Protein A aus *Staphylococcus aureus* (2 bis 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) behandelt. Abschließend wurden die Filter mehrmals gewaschen und getrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

11. Enzymtest für β -Galactosidase

Der Enzymtest wurde nach der Beschreibung von Miller (1972) durchgeführt. Das Wachstum der Kulturen wurde bei einer OD_{600} von 0.4 bis 0.5 durch Abkühlen auf Eis abgebrochen. Anzuchten in TGYEP-Medium erforderten das Abzentrifugieren und Waschen der Zellen. Sie wurden anschließend in WM-Salzen (pH 7.0) resuspendiert und mit SDS und Chloroform aufgeschlossen. Als chromogenes Enzymsubstrat wurde ONPG verwendet. Die Aktivität der β -Galactosidase wird in relativen Einheiten pro OD_{600} angegeben und ist ungefähr der Zahl der Enzymmoleküle pro Zelle äquivalent (113).

12. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen

Enzyme zur Restriktion und Modifikation von DNA sowie Ribon- und Desoxyribonucleotide wurden bei Boehringer Mannheim und Pharmacia (Freiburg) gekauft. Der 10mer BamHI-Linker stammte von New England Biolabs (Schwalbach). Tris besonderer Reinheit (Trizma) wurde von Sigma (München) bezogen.

Sämtliche radioaktiv markierten Verbindungen waren von Amersham Buchler (Braunschweig) oder New England Nuclear (Dreieich).

NC-Filter (BA85) stammten von Schleicher & Schüll (Dassel), Benzylviologen von Serva (Heidelberg).

ERGEBNISSE

1. Genetische Charakterisierung des chromosomalen fdhF Gens a) Kartierung durch P1 Transduktion

Im Rahmen der Diplomarbeit (191) war die Lage des Genorts fdhF bereits auf den Bereich um Minute 93 des E. coli Chromosoms eingegrenzt worden. Transduktionsexperimente ergaben für ΔfdhF eine genetische Kopplung von 3 % mit purA und 55 % mit mel. Um eine genauere Kartierung durchzuführen, waren zusätzliche Transduktionsexperimente notwendig.

Da der Marker fdhF weder als Wildtyp- noch als mutiertes Allel Möglichkeiten zur Selektion bot, erfolgte bei Transduktionen die Selektion immer auf Nachbarmarkern. Für fdhF wurde anschließend die Cotransduktionsfrequenz bestimmt.

In der ersten Serie an Transduktionen wurden zunächst Zwei-Faktoren-Kreuzungen mit dem Phagen P1 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Für ΔfdhF und mel⁺ betrug die Kopplung 61 %, für fdhF::Mu dl und mel⁻ sank der Wert jedoch auf 1 % ab. Da der Mu-Prophage in fdhF nur durch Rekombination an beiden Flanken der Insertionsstelle ins Chromosom des Rezipienten integriert werden kann, ergeben Segmente, die nur Teile des Prophagen enthalten, keine Transduktanten. Deshalb ist mit einem steilen Abfall der Cotransduktionsrate für Marker in der Nachbarschaft der Mu-Insertion zu rechnen.

Tabelle 5: Cotransduktionsanalyse mit fdhF, mel, ampA und frdA durch Zwei-Faktoren-Kreuzungen mit dem Phagen P1

Donor	Rezipient	selektierter Marker	nichtselektierter Marker	Cotransduktions- frequenz in %
FM909	RW262	<u>mel</u> ⁺	Δ <u>fdhF</u>	61 % (61/100)
M9s	RW262	<u>fdhF</u> ::Mu d1	<u>mel</u> ⁺	1 % (2/200)
FM909	JRG780	<u>frdA</u> ⁺	Δ <u>fdhF</u>	8 % (16/200)
G11a1	FM909	<u>ampA</u> ⁻	<u>fdhF</u> ⁺	0.5 % (1/200)

Die Kopplung von Δ fdhF mit frdA⁺ betrug nur 8 %. Es war deshalb wahrscheinlich, daß sich fdhF außerhalb des Segments mel-frdA befand. Für fdhF⁺ und ampA⁻ wurde ein ähnlicher Wert der Cotransduktionshäufigkeit erwartet. Der gefundene Wert lag jedoch mit 0.5 % noch deutlich niedriger. Damit ergaben sich erste Hinweise, daß die fdhF Deletion in FM909 beträchtlich mehr als nur einige hundert Basenpaare umfassen mußte.

Um die Anordnung der Genloci untereinander festzulegen, wurden weitere Transduktionen in Form von Drei-Faktoren-Kreuzungen durchgeführt. Dazu wurden auch Stämme mit der Markerkombination fdhF⁻ mel⁻ benötigt, die durch eine Transposonmutagenese konstruiert wurden.

Für die Transposonmutagenese wurde λ NK370 verwendet, in dessen Genom Tn10 integriert ist. Aufgrund einer UGA-Mutation im Gen O kann λ NK370 in suppressorfreien Stämmen nicht vermehrt werden. Andere Mutationen verhindern die Integration des Phagengenoms ins Wirtschromosom. Nach Infektion mit λ NK370 werden deshalb nur die Zellen Tc-

resistent, in denen Tn10 vom Phagen ins Wirtschromosom transponiert (87). Tn10-Insertionen führen zum Ausfall des betroffenen Gens (88).

Als Rezipient für die Tn10-Mutagenese diente FM909 (Δ fdhF), ein temperaturinsensitiver Abkömmling von M9 (fdhF::Mu dl) (126), der seine Mu-Insertion ganz oder teilweise verloren hatte. Die infizierten Zellen wurden auf MacConkey Melibiose Tetracyclin Agar ausplattiert. Unter 4 000 Tc-resistenten Kolonien konnten zwei Mutanten identifiziert werden (FM931, FM932), die mit Melibiose als alleiniger C-Quelle nicht mehr wachsen konnten. Beide Stämme wurden durch das ColEI-Hybrid pLC25-33 (melA⁺B⁺) komplementiert. Beide Mutanten wurden in Drei-Faktoren-Kreuzungen parallel verwendet und verhielten sich immer identisch. In Tabelle 6, in der die Ergebnisse der Drei-Faktoren-Kreuzungen zusammengefaßt sind, werden deshalb nur die Daten mit FM932 aufgeführt.

In der Kreuzung JRG780 mit FM2626 wurde auf den Mittelmarker (mel⁺) selektiert. Es zeigte sich, daß entweder nur das Segment fdhF-mel oder das Segment mel-frdA transduziert wurde. Daraus ergibt sich als Reihenfolge der Gene fdhF-mel-frdA. Die Cotransduktionshäufigkeit für mel⁺ mit fdhF⁺ betrug 30 %. Dabei müssen Segmente einrekombinieren, die von der Punktmutation in mel bis zur Mu-Insertionsstelle in fdhF reichen. Insofern gibt dieser Wert den Abstand der beiden Gene im Rahmen dieser Arbeit am genauesten an, er beträgt 0.75 min (187). Entsprechend befindet sich fdhF bei Minute 92.6 auf der Chromosomenkarte von E. coli (4).

In der analogen Kreuzung JRG780 mit FM932 wurde ebenfalls auf mel⁺ selektiert. Die etwas geringere Cotransduktionshäufigkeit für fdhF⁺ und mel⁺ (18.5 % statt 30 %) erklärt sich damit, daß die transduzierten Segmente die gesamte fdhF-Deletion überdecken müssen.

Tabelle 6: Kartierung von fdhF durch Drei-Faktoren-Kreuzungen mit dem Phagen P1

Donor	Rezipient	selektierter Marker	Transduktanten- klassen	Cotransduktions- frequenzen
JRG780 (<u>frdA</u>)	FM2626 (<u>mel</u> -1 <u>fdhF</u> ::Mu d1)	<u>mel</u> ⁺	<u>fdhF</u> ⁻ <u>frdA</u> ⁺ <u>fdhF</u> ⁺ <u>frdA</u> ⁺ <u>fdhF</u> ⁻ <u>frdA</u> ⁻ <u>fdhF</u> ⁺ <u>frdA</u> ⁻	53 % (61/116) 29 % (34/116) 17 % (20/116) 1 % (1/116)
JRG780 (<u>frdA</u>)	FM932 (<u>mel</u> ::Tn10 <u>Δ fdhF</u>)	<u>mel</u> ⁺	<u>Δ fdhF</u> <u>frdA</u> ⁺ <u>fdhF</u> ⁺ <u>frdA</u> ⁺ <u>Δ fdhF</u> <u>frdA</u> ⁻ <u>fdhF</u> ⁺ <u>frdA</u> ⁻	57 % (114/200) 18 % (36/200) 24.5 % (49/200) 0.5 % (1/200)
FM932 (<u>Δ fdhF</u> <u>mel</u> ::Tn10)	JRG780 (<u>frdA</u>)	<u>frdA</u> ⁺	<u>mel</u> ⁺ <u>fdhF</u> ⁺ <u>mel</u> ⁻ <u>fdhF</u> ⁺ <u>mel</u> ⁻ <u>Δ fdhF</u> <u>mel</u> ⁺ <u>Δ fdhF</u>	95.5 % (382/400) 2.5 % (10/400) 2 % (8/400) 0 % (0/400)

In der Kreuzung FM932 mit JRG780 wurde auf frdA⁺ als außenliegenden Marker selektiert. Die Cotransduktionsrate für mel⁻ lag in diesem Versuch unerwartet niedrig (4.5 % statt 18-25 %). Dennoch kann aus der Markerkombination der 4-cross-over Klasse die Reihenfolge der Gene mit fdhF-mel-frdA abgeleitet werden; das Ergebnis dieses Versuchs steht daher in vollem Einklang mit den Daten aller anderen Kreuzungen.

b) Bestimmung der Transkriptionsrichtung von fdhF

Chumley et al. (1979) konstruierten mit Hilfe eines F'lac-Episoms, dessen Replikation temperatursensitiv ist, Hfr-Stämme in *S. typhimurium*. Dieses System kann in *E. coli* auch dazu benutzt werden, um einfach und direkt die Orientierung eines mit lac fusionierten Gens auf dem Chromosom zu bestimmen (6). Dazu werden bei 42°C Klone isoliert, in denen das F'-Episom über die homologen lac Regionen ins Chromosom integriert (Abb. 1). Die Orientierung des episomalen oriT bewirkt dabei, daß promotor-distal zur lac Fusion gelegene Gene beim Chromosomentransfer als frühe Marker mit großer Häufigkeit übertragen werden. Aus der Transferrichtung kann die Transkriptionsrichtung des mit lac fusionierten Gens abgeleitet werden.

Nach dem Transfer des F'-Episoms in M9s (fdhF::lac) wurden drei unabhängige Hfr-Derivate isoliert. Als Rezipienten (FM1, FM2) dienten spontan entstandene gyrA-Derivate polyauxotropher Stämme, von denen einer lysogen für $\text{Mu } c^+$ war. Jeder der drei Hfr-Stämme wurde jeweils mit FM1 und FM2 gekreuzt. Die Ergebnisse der unterbrochenen Chromosomentransfers (45 min) sind in Tabelle 7 dargestellt.

In allen Kreuzungen wurden die Gene metA, argE und ilvA mit hoher Effizienz, die Gene thr, leuB und proA dagegen mit geringer Rate übertragen. Die Anwesenheit eines Mu-Prophagen im Rezipienten FM2 hatte dabei jedoch keinen Einfluß auf Transferrate und -richtung.

Aus den Versuchsergebnissen kann abgeleitet werden, daß fdhF in *E. coli*, gemäß konventioneller Darstellung der Chromosomenkarte (4), gegen den Uhrzeigersinn transkribiert wird.

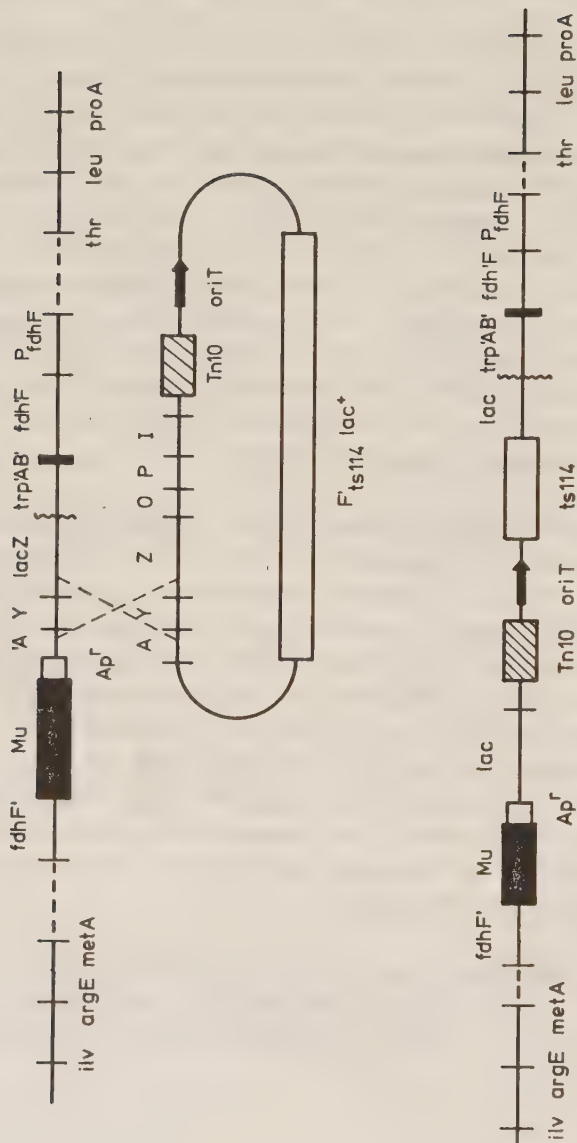


Abbildung 1: Integration von F'_{ts114} in das Chromosom durch homologe Rekombination an der $fdhF::lacZ$ Fusion.

Tabelle 7: Chromosomentransfer zur Bestimmung der Transkriptionsrichtung von fdhF

Rezipient	selektierter Marker ^a	Zahl der Rekombinanten ^b
FM1	<u>leuB</u> ⁺	1.4×10^4
	<u>metA</u> ⁺	4.0×10^6
	<u>ilvA</u> ⁺	3.8×10^6
FM2	<u>argE</u> ⁺	4.2×10^6
	<u>thr</u> ⁺	5.0×10^4
	<u>proA</u> ⁺	4.0×10^4

^a Gegenselektion mit Nalidixinsäure.

^b 3.6×10^8 Hfr-Zellen wurden mit 2.4×10^9 F'-Zellen in 4 ml LB-Medium 45 min bei 37°C inkubiert. Die Zahl der Rekombinanten bezieht sich auf den Gesamtansatz.

2. Klonierung von fdhF

a) Analyse der Selenoproteine in fdhF-Mutanten

Die Mutante M9s bildet aufgrund der Mu-Insertion in fdhF statt des 80 kDa FDH_H -Selenoproteins ein verkürztes Polypeptid mit 68 kDa (125). Unbekannt war jedoch, wie sich in der Mutante FM909 die Deletion im fdhF-Genlocus auf Proteinebene manifestieren würde.

Die isogenen Stämme MC4100 (fdhF^+), M9s ($\text{fdhF}::\text{Mu dl}$) und FM909 (ΔfdhF) wurden deshalb unter anaeroben Bedingungen angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Das Autoradiogramm nach Elektrophorese der Zellextrakte auf 8 % SDS-Polyacrylamidgelen ist in Abbildung 2 zu sehen.

Die Expression des 110 kDa FDH_N -Selenoproteins war in allen drei Stämmen unverändert. Das 80 kDa FDH_H -Selenoprotein hingegen wurde nur vom Elternstamm MC4100 gebildet. M9s synthetisierte wie erwartet ein kürzeres Selenopolypeptid von 68 kDa, in FM909 jedoch war kein Selenoprotein mehr nachweisbar. Entweder wurde also in FM909 kein FDH_H -Selenoprotein mehr gebildet oder aber es war so kurz, daß kein Selen mehr eingebaut werden konnte.

b) Klonierungsstrategie und Stammkonstruktionen

Nachdem bereits charakterisierte Mutanten (M9s, FM909) vorlagen, bot sich ihre Verwendung an, um das fdhF Gen durch Komplementation zu klonieren. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, daß die Transformationsrate dieser Stämme für "Shotgun" Ansätze zu niedrig war, sie lag bei nur 10^4 Kolonien/ μg Plasmid-DNA. Es war deshalb notwendig, auf der Basis eines gut transformierbaren Stammes geeignete fdhF Mutanten zu konstruieren.

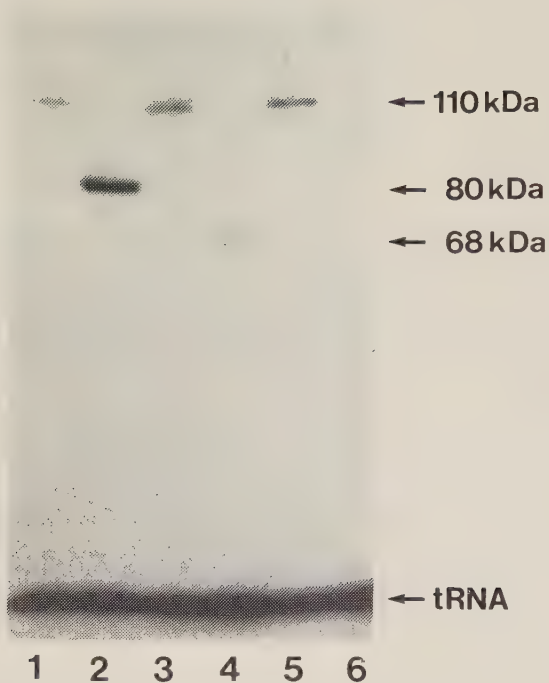


Abbildung 2:

Autoradiogramm von SDS-Extrakten ^{75}Se -Selenit markierter Zellen nach anaerober Anzucht mit und ohne Nitrat.

- Spur 1: MC4100 mit Nitrat
- Spur 2: MC4100 ohne Nitrat
- Spur 3: M9s mit Nitrat
- Spur 4: M9s ohne Nitrat
- Spur 5: FM909 mit Nitrat
- Spur 6: FM909 ohne Nitrat

Der Ausgangsstamm dazu war FM1200, ein F^- -Derivat von JM103 (110). Durch Transduktion und Konjugation wurden die Abkömmlinge FM1222 (fdhF::Mu d1 recA56) und FM1216 (Δ fdhF) erhalten (Abb. 3 A). Da zu Beginn der Arbeit das Ausmaß der fdhF Deletion nicht bekannt war, wurde zunächst FM1222 für die "Shotgun" Klonierung und für Subklonierungen eingesetzt.

Als Derivat von FM909 entstand FM911 (Δ fdhF, recA56) (Abb. 3 B). Fast alle konstruierten Plasmide dieser Arbeit wurden in diesen Stamm transformiert, um Komplementationsanalysen und ^{75}Se -Markierungen durchzuführen. FM911 wurde auch in Maxizellexperimenten eingesetzt.

Als Plasmidvektor wurde pACYC184 verwendet (22). Der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Chloramphenicol und Tetracyclin und konnte deshalb ohne Einschränkungen auch mit FM1222 verwendet werden. Chromosomale DNA wurde aus MC4100 isoliert, der bezüglich der Enzymaktivitäten des FHL-Komplexes gut untersucht war (125, 126).

Als Indikatorreaktion wurde die anaerobe Reduktion von Benzylviologen (BV) durch Formiat (105) benutzt, da sie zur Überprüfung sehr vieler Klone auf Agar geeignet war. Wildtypkolonien färben sich innerhalb weniger Minuten durch das reduzierte BV tiefblau, während Kolonien von Mutanten farblos bleiben. Phosphatgepuffertes TGYEP-Medium erwies sich für die Differenzierung der Klone als besonders geeignet und ermöglichte eine sehr intensive BV-Farbreaktion.

c) "Shotgun" Klonierung von fdhF

Chromosomale DNA aus MC4100 und Plasmid-DNA des Vektors pACYC184 wurde mit BamHI gespalten, gemischt und mit T4 DNA Ligase kovalent verbunden. Der Ligationsansatz wurde in FM1222 (fdhF::Mu d1 recA) transformiert. Nach zwei Tagen

A)

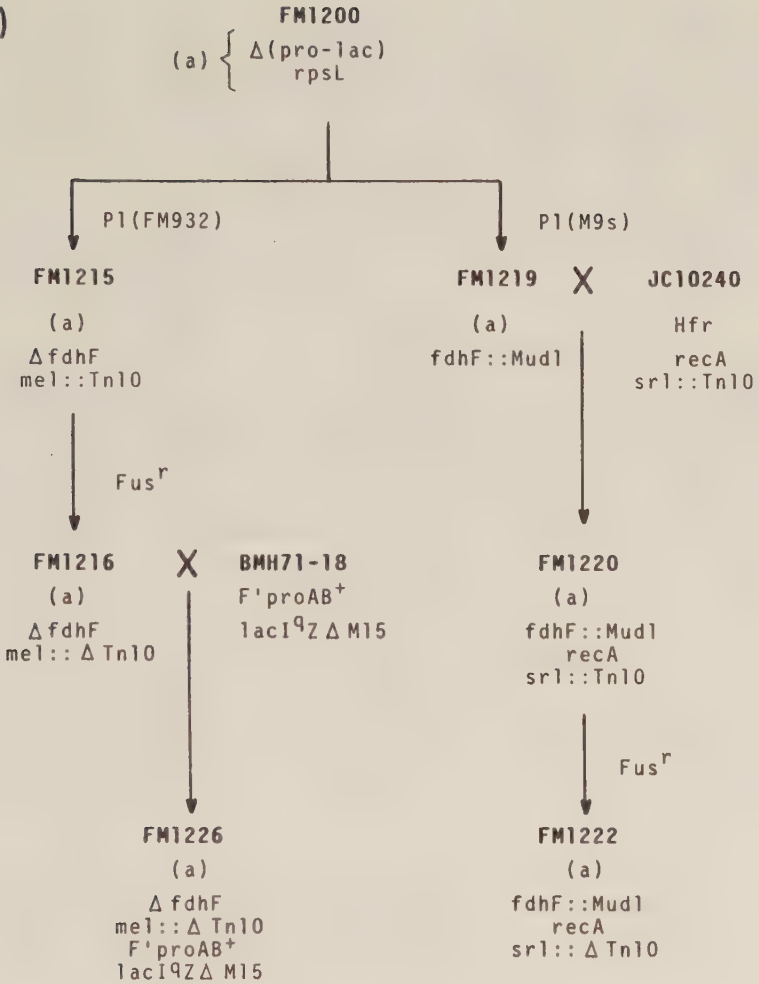


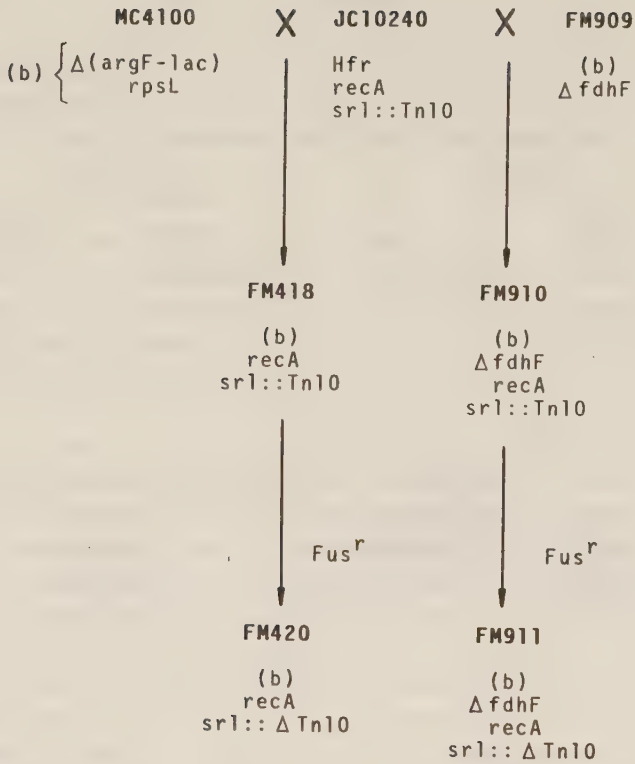
Abbildung 3:

(A) Stammbaum der Abkömmlinge von FM1200.

(B) Stammbaum der Abkömmlinge von MC4100.

P1(FM932): Transduktion mit P1 Lysat des Stammes FM932;
Fus^r: resistent gegen Fusarsäure.

B)



Bebrütung unter N_2 -Atmosphäre wurden die Platten mit BV-Agar überschichtet. Zwei von ungefähr 5 000 rekombinanten Klonen färbten sich tiefblau. Die Kolonien wurden abgeimpft, subkultiviert und nochmals auf BV-Reduktion getestet. Aus dem einzigen Klon, der dann noch positive Reaktion zeigte, wurde die Plasmid-DNA isoliert und in FM911 transformiert. Alle Transformanten, die dieses Plasmid (pFM3) enthielten, waren BV-positiv und konnten wie der Elternstamm MC4100 Gas bilden.

Zur physikalischen Kartierung wurde DNA des Plasmids pFM3 mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Da dam-methylierte DNA von einigen Enzymen nicht gespalten werden kann (106), wurde auch aus WA321 (dam-4) DNA von pFM3 isoliert und gespalten; dabei wurde noch eine zusätzliche BclI-Stelle gefunden. Die Restriktionskarte von pFM3 ist in Abbildung 4 dargestellt, pFM3 enthält ein 6.2 kb BamHI Fragment chromosomaler DNA aus MC4100.

d) Komplementationsanalyse durch Subklonierung

Als nächstes wurde auf dem 6.2 kb BamHI Fragment der Bereich eingegrenzt und identifiziert, in dem sich das fdhF Gen befindet.

Dazu wurde eine Reihe von kleineren Fragmenten subkloniert und auf Komplementation in FM1222 und FM911 getestet. Die Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt, in Abbildung 5 sind die Ergebnisse der Komplementationsanalyse zusammengefaßt. Das intakte fdhF Gen befindet sich auf einem 3.0 kb MluI-BglII Fragment (pFM26). Neben dem Plasmid pFM26 konnten nur noch die Plasmide pFM14 und pFM20 komplementieren. Das beobachtete Komplementationsmuster war in beiden Rezipienten identisch.

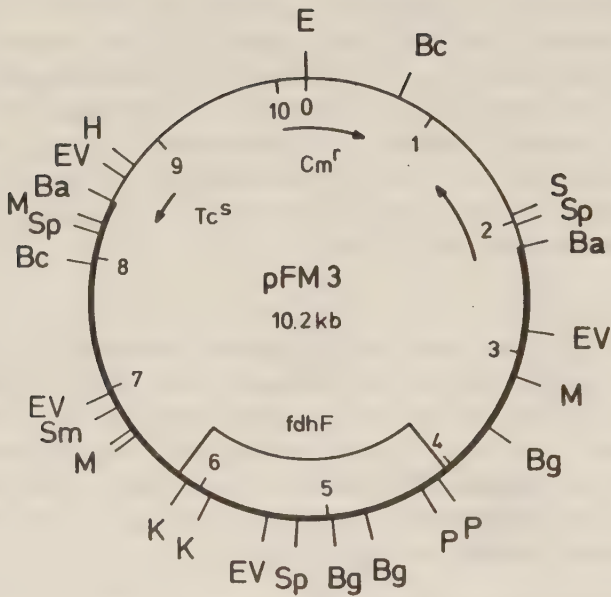


Abbildung 4:

Restriktionskarte des Plasmids pFM3 (*fdhF*⁺).
 Dünne Linie: Anteil des Vektors pACYC184;
 starke Linie: 6.2 kb BamHI Insert chromoso-
 maler DNA.

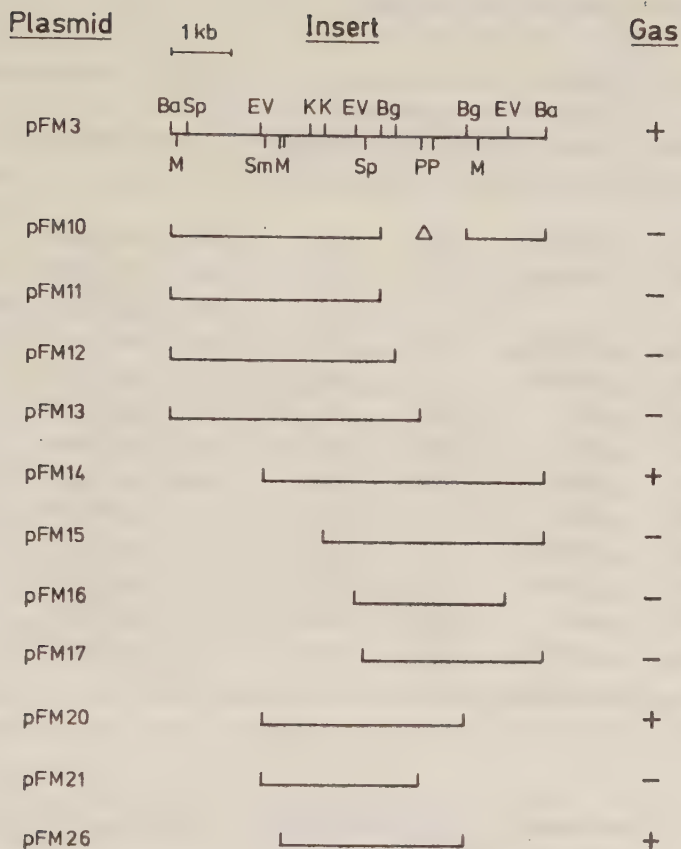


Abbildung 5:

Komplementationsanalyse des klonierten fdhF Gens.
 Gas: Test auf anaerobe Bildung von Gas aus Glucose
 in den Rezipienten FM911 und FM1222.

Tabelle 8: Subklonierung von fdhF

Plasmid	Vektor	Größe (kb)	Resistenz	Insertfragment (kb)
pFM3	pACYC184	10.2	Cm	6.2; BamHI-BamHI
pFM10	pACYC184	8.8	Cm	4.8; 1.15 und 0.24 kb BglII-Fragmente deletiert
pFM11	pACYC184	7.45	Cm	3.45; BamHI-BglII
pFM12	pACYC184	7.7	Cm	3.7; BamHI-BglII
pFM13	pGA22	10.2	Cm Tc	4.1; BamHI-PvuI
pFM14	pGA22	10.25	Cm Ap	4.7; SmaI-BamHI
pFM15	pGA44	10.65	Cm	3.65; KpnI-BamHI
pFM16	pBR322	7.0	Ap	2.6; EcoRV-EcoRV
pFM17	pACYC184	7.2	Cm	3.2; SphI-SphI
pFM20	pACYC184	6.25	Cm	3.3; SmaI-BglII
pFM21	pGA22	5.45	Cm	2.5; SmaI-PvuI
pFM26	pACYC184	5.8	Cm	3.0; MluI-BglII

e) Bestimmung der Orientierung von fdhF auf dem klonierten DNA-Segment

Das Auftreten eines verkürzten FDH_H -Selenopolypeptids in der Mutante M9s (fdhF::Mu dI) machte es wahrscheinlich, daß vom promotor-distalen Ende her verkürzte plasmidkodierte fdhF Gensegmente zur Synthese entsprechend kleinerer Selenoproteine führen könnten. Das Fehlen des Promotors und der Region des Translationsstarts würde sich andererseits so auswirken, daß kein FDH_H -Selenoprotein mehr gebildet werden kann. Entsprechend läßt sich daraus die Orientierung des fdhF Gens auf den klonierten DNA-Segmenten ableiten.

Kulturen von FM911 mit den Plasmiden pACY184, pFM3, pFM10 und pFM15 wurden deshalb anaerob angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Als Referenzstamm diente FM420, dessen chromosomales fdhF Gen noch intakt war. In Abbildung 6 sind eine vereinfachte Restriktionskarte der verwendeten Plasmide und das Autoradiogramm des SDS-Polyacrylamidgels zu sehen, auf dem die markierten Zellextrakte aufgetrennt wurden.

Im Extrakt von FM911/pFM3 war die Bande des 80 kDa Selenoproteins stärker ausgeprägt als im Referenzstamm FM420. Die erhöhte Syntheserate ist vermutlich dem Gen-Dosis-Effekt des plasmidkodierten fdhF Gens zuzuschreiben. Die Syntheserate war aber nicht so hoch, wie nach der bekannten Kopienzahl des Vektors pACY184 zu erwarten war (22). FM911/pFM10 synthetisierte ein verkürztes Selenoprotein mit ca. 60 kDa. Wie schon bei M9s beobachtet (125), war die Bande bedeutend schwächer ausgeprägt als die des 80 kDa Wildtypproteins. Wahrscheinlich wurde das funktionsuntüchtige Rumpfpolypeptid von zelleigenen Proteasen abgebaut. Aus der Größe des Selenoproteins abgeleitet, kann der Promotor und der Translationsstart im Bereich des 0.9 kb SmaI-KpnI Fragments lokalisiert werden. Wie FM911/pACYC184 zeigte auch FM911/pFM15 keine Expression eines 80 kDa Selenoproteins. Dem entspricht, daß in pFM15 jenes 0.9 kb SmaI-KpnI Fragment fehlt, in dem der Beginn des offenen Leserahmens zu vermuten ist. Damit kann die Orientierung des klonierten fdhF Gens angegeben werden (Abb. 6).

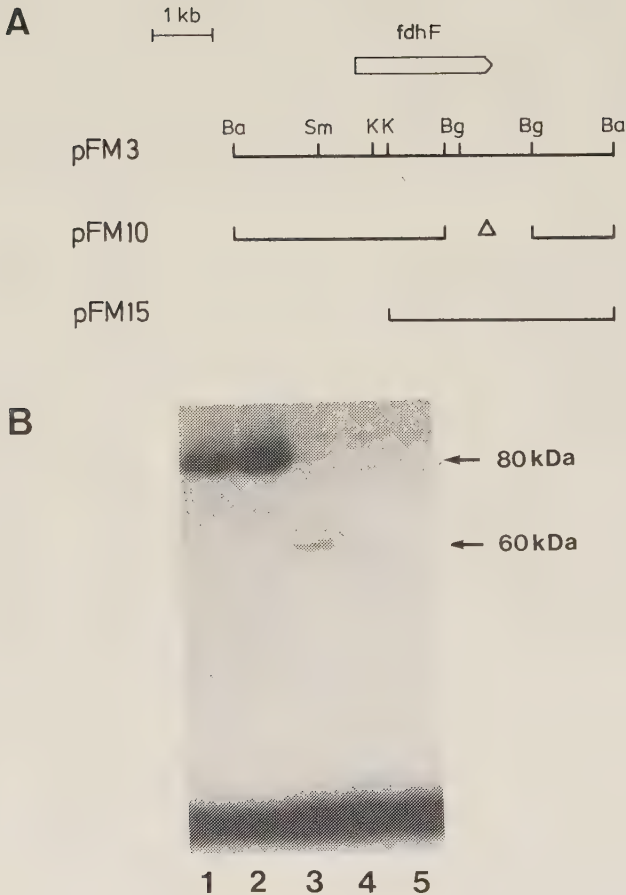


Abbildung 6:

Bestimmung der Orientierung des klonierten *fdhF* Gens.
(A) Vereinfachte Restriktionskarte des Inserts der verwendeten Plasmide.

(B) Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte von FM911 mit diesen Plasmiden.

Spur 1: FM420 (*fdhF*⁺)
Spur 2: pFM3
Spur 3: pFM10

Spur 4: pFM15
Spur 5: pACYC184

f) Konstruktion von Plasmiden mit terminalen Deletionen im fdhF Gen

Im Bereich des 3.3 kb SmaI-BglII Inserts von pFM20, auf dem sich das gesamte fdhF Gen befindet, eigneten sich nur wenige der bereits kartierten Restriktionsstellen zur DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert. Deshalb wurden nach Behandlung mit Exonuclease Bal31 Plasmide isoliert, deren Insert verkürzt war und an einem Ende eine BamHI-Stelle aufwies, von der aus sequenziert werden konnte. Das fdhF Gen wurde vom promotor-distalen Ende her verkürzt, daher konnten die resultierenden Plasmide auch benutzt werden, um die Synthese verkürzter Selenopolypeptide zu untersuchen. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 7 dargestellt.

10 µg DNA des Plasmids pFM20 wurden mit HindIII linearisiert und mit 0.9 Einheiten Bal31 bei 30°C inkubiert. Die in Vorversuchen ermittelte Abbaurrate lag bei 200 bp/min. Aliquots wurden zu vier verschiedenen Zeiten entnommen, die DNA wurde nach Phenolextraktion vereinigt und mit Äthanol gefällt. Durch Behandlung mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurden 5' überhängende Enden aufgefüllt, die beim Abbau durch Bal31 entstanden waren. Anschließend wurden BamHI-Linker (dCGGGATCCCG) anligiert. Um überzählige Linkermoleküle abzutrennen, erfolgte die Spaltung mit BamHI. Zusätzlich wurden die DNA-Fragmente mit EcoRI gespalten. Eine EcoRI-Stelle befindet sich im Gen für die Cm-Resistenz im Vektoranteil von pFM20. Durch präparative Gelelektrophorese wurden die verkürzten DNA-Fragmente größenfraktioniert und abgespaltene Linker entfernt.

Parallel dazu wurden 3 µg pACYC184 DNA mit BamHI und EcoRI gespalten. Die beiden resultierenden Fragmente (1.8 und 2.2 kb) wurden auf einem präparativen Agarosegel getrennt. Das kleinere Fragment wurde schließlich mit den vier Fraktionen der Bal31-verkürzten DNA aus pFM20 ligiert und in den Stamm DH1 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Cm-Resistenz.

Durch Ligation von Insert und Vektorfragment an der EcoRI-Stelle wurde das Cm-Resistenzgen wieder rekonstituiert. Dadurch war gewährleistet, daß nur die gewünschten Fragmente kloniert wurden; es konnte also auf rekombinante Plasmide selektiert werden.

Aus 48 Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert und auf die Größe des Inserts hin untersucht. Es wurden schließlich neun Plasmide (pFM30-pFM38) ausgewählt und in den folgenden Experimenten verwendet.

Die Komplementationsanalyse dieser Plasmide in FM1222 und FM911 ergab, daß nur pFM30 ein noch intaktes fdhF Gen enthielt. Die Genprodukte der anderen acht Plasmide waren enzymatisch inaktiv. Da das Insert in pFM31 nur um etwa 100 bp kürzer war als in pFM30, konnte das Ende des offenen Leserahmens von fdhF recht genau lokalisiert werden (siehe Abb. 11 C).

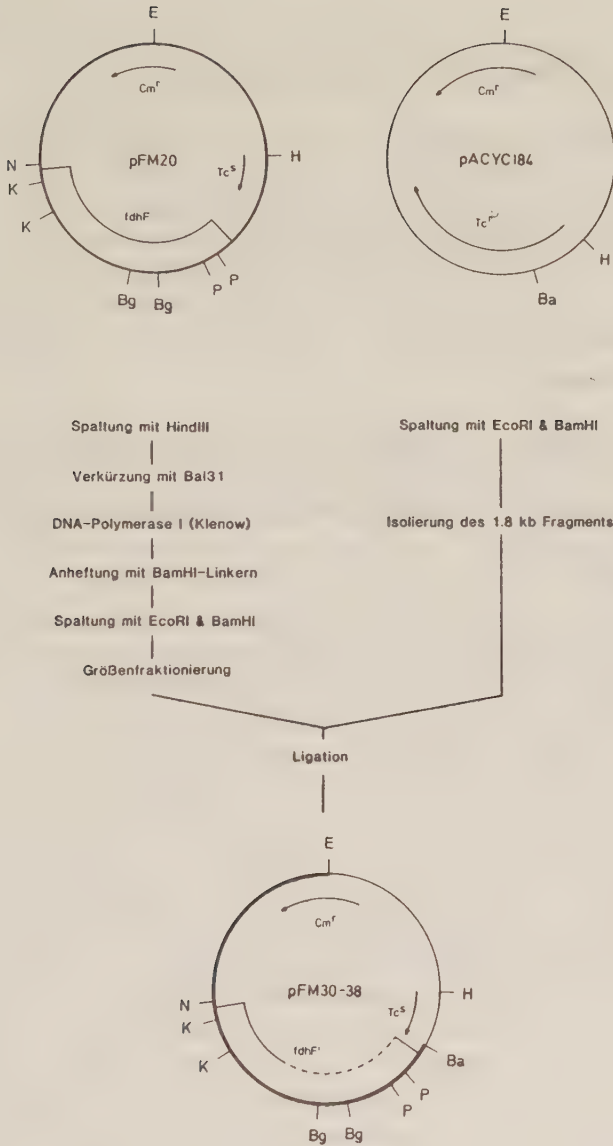


Abbildung 7: Verkürzung des *ldhF* Gens mit Exonuclease *Bal31*.

3. Bestimmung der DNA-Sequenz von fdhF

Die Sequenz des fdhF Gens und der flankierenden Regionen wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) bestimmt. Insgesamt wurden rund 3000 bp sequenziert. Die Sequenzierstrategie ist in Abbildung 8 dargestellt. Bis auf ein 44 bp langes MluI-MluI Fragment stromaufwärts vor dem fdhF Promotor wurden durchgehend und überlappend beide DNA-Stränge sequenziert, die Sequenz ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

Die Translation der DNA-Sequenz in beiden Richtungen und in jeweils drei Leserastern ergab (mit einem Vorbehalt) nur einen ausreichend großen offenen Leserahmen für ein Protein mit 80 kDa (Abb. 9). Der Vorbehalt bezieht sich auf das Vorkommen eines internen UGA (Stopp) Codons an Position 1166-1168. Der Leserahmen beginnt mit einem AUG Codon an Position 749-751 und endet mit einem UAA Codon an Position 2894-2896. Er kodiert (einschließlich UGA Codon) für 715 Aminosäuren, was einem Protein mit einem Molekulargewicht von 79 200 Da entspricht. Dieser Wert stimmt sehr gut mit Literaturdaten (42) über das Selenoprotein der FDH_H überein. In Tabelle 9 sind die aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuren nach der Häufigkeit ihres Vorkommens aufgeschlüsselt. Das Spektrum der Aminosäuren im fdhF Genprodukt entspricht bis auf geringfügige Abweichungen dem Standard der Proteine in *E. coli* (47). Die Häufigkeitsverteilung der verwendeten Aminosäuretripletts ist in Tabelle 10 dargestellt. Sie ähnelt stark der von gut exprimierten Genen in *E. coli*; entsprechend werden z.B. die Codons AGA und AGG in fdhF überhaupt nicht verwendet (83).

Als Signal für den Translationsstart findet sich 8 bp stromauf des AUG Codons als mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (156) das Motiv GGAG, das zusammen mit dem Startcodon als ribosomale Bindungsstelle fungieren kann (165).

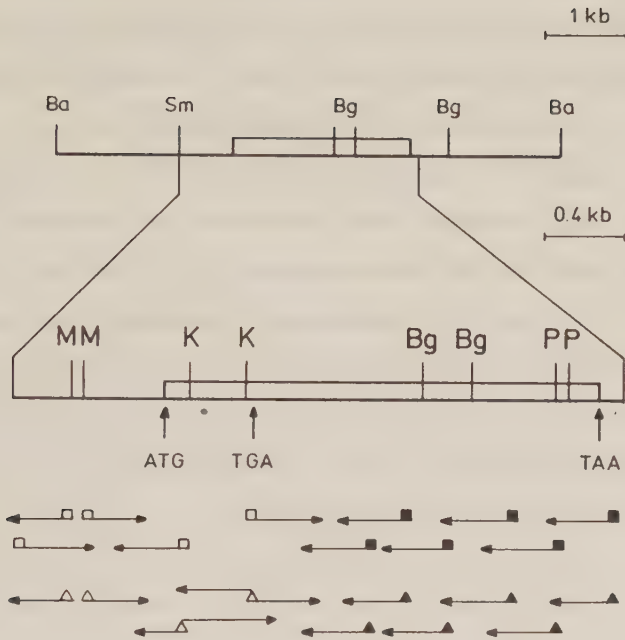


Abbildung 8:

Strategie zur Sequenzierung des *fdhF* Gens.

Im oberen Teil ist das 6.2 kb BamHI Insert des Plasmids pFM3 dargestellt, der untere Teil zeigt den sequenzierten Bereich. 5'-Markierungen werden durch offene Quadrate, 3'-Markierungen durch offene Dreiecke angezeigt. Ausgefüllte Symbole bezeichnen Markierungen an BamHI-verkürzten Plasmiden (pFM30-pFM38), deren Insert jeweils von einem BamHI-Linker flankiert wird. Zur Markierung an der SmaI-Stelle wurde die DNA mit AvaI gespalten, zur Markierung an der KpnI-Stelle mit Asp718.

2
GGCGTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTCGGGCGACGATAGTCATGCCCCGGCG

82
CCACCGGAAGAGCTACCGCGAGCGGTGCGGACTGTTGTAACCTCAGAATAAGAAATGAGGCCGCTCATGGCGTTGTTGTCG

162
AAATGCGCGTGTTGACGGTGGACGGTTGAATGCCAATCTCGAAGGCACGCGCGCCCGCAGCAACATGATGATTGAACG

242
TTACAACCACTAGTACTGAACGCGGTGCGTGCAGTTCGCCGTCAACGGCACGCGTCTGCAAAACGCTCAACGACGACGAG

322
AAATGACGGCTGAACGCGTGAAGGCCACGCGCTTACCACGCGCGTGGCGAGGCGCCCTCATGCGCGGGTTAACCAGC

402
CGCTTACAGGCCACCGAAGCCCGGTTGCCAGTGCTTGCCGAAGAGATGTCATTACTGATGCTGGACGCCCGCGGGTGAT

482
CCAAAGCATTGAGTTGATGAATCGTGGCGCGGGGTATCAGGCAGGTCCCGTCTGCAGAAAAATAAAATGTCTGCC

562
CGGTGATGGCTGTCACGCGGTATTTCGTTTCGTACAGTCAAAACTGACGACACGCTGTTTTTCGTGACAGTTTTGAATAA

642
ATAGTCCCCGTAATATCAGGGAATGACCCACATAAAATGTGGCATAAAAGATGCATACCTAGTCGAGAGCGCGTATGC

722
GTGATTGATTAACTGGAGCAGACCG Met Lys Lys Val Val Thr Val Cys Pro Tyr Cys Ala Ser
ATG AAA AAA GTC GTC ACG GTT TGC CCC TAT TGC GCA TCA

788
Gly Cys Lys Ile Asn Leu Val Val Asp Asn Gly Lys Ile Val Arg Ala Glu Ala Ala Gln
GGT TGC AAA ATC AAC CTG GTC GTC GAT AAC GGC AAA ATC GTC CGG GCG GAG GCA GCG CAG

848
Gly Lys Thr Asn Gln Gly Thr Leu Cys Leu Lys Gly Tyr Tyr Gly Trp Asp Phe Ile Asn
GGG AAA ACC AAC CAG GGT ACC CTG TGT CTG AAG GGT TAT TAT GGC TGG GAC TTC ATT AAC

908
Asp Thr Gln Ile Leu Thr Pro Arg Leu Lys Thr Pro Met Ile Arg Arg Gln Arg Gly Gly
GAT ACC CAG ATC CTG ACC CCG GCG CTG AAA ACC CCC ATG ATC CGT GCG CAG CGT GGC GGC

968
Lys Leu Glu Pro Val Ser Trp Asp Glu Ala Leu Asn Tyr Val Ala Glu Arg Leu Ser Ala
AAA CTC GAA CCT GTT TCC TGG GAT GAG GCA CTG AAT TAC GTT GCC GAG GCG CTG AGC GCC

1028
Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Pro Asp Ala Ile Gln Thr Thr Gly Ser Ser Arg Gly Thr Gly
ATC AAA GAG AAG TAC GGT CCG GAT GCC ATC CAG ACG ACC GGC TCC TCG CGT GGT ACG GGT

1088
Asn Glu Thr Asn Tyr Val Met Gln Lys Phe Ala Arg Ala Val Ile Gly Thr Asn Asn Val
AAC GAA ACC AAC TAT GTA ATG CAA AAA TTT GCG GCG GCC GTT ATT GGT ACC AAT AAC GTT

1148
Asp Cys Cys Ala Arg Val SSS His Gly Pro Ser Val Ala Gly Leu His Gln Ser Val Gly
GAC TGC TGC GCT CGT GTC TGA CAC GGC CCA TCG GTT GCA GGT CTG CAC CAA TCG GTC GGT

1208
Asn Gly Ala Met Ser Asn Ala Ile Asn Glu Ile Asp Asn Thr Asp Leu Val Phe Val Phe
AAT GGC GCA ATG AGC AAT GCT ATT AAC GAA ATT GAT AAT ACC GAT TTA GTG TTC GTT TTC

1268
Gly Tyr Asn Pro Ala Asp Ser His Pro Ile Val Ala Asn His Val Ile Asn Ala Lys Arg
GGG TAC AAC CCG GCG GAT TCC CAC CCA ATC GTG GCG AAT CAC GTA ATT AAC GCT AAA CGT

1328
Asn Gly Ala Lys Ile Ile Val Cys Asp Pro Arg Lys Ile Glu Thr Ala Arg Ile Ala Asp
AAC GGG GCG AAA ATT ATC GTC TGC GAT CCG GCG AAA ATT GAA ACC GCG GCG ATT GCT GAC

1388
Met His Ile Ala Leu Lys Asn Gly Ser Asn Ile Ala Leu Leu Asn Ala Met Gly His Val
ATG CAC ATT GCA CTG AAG AAA AAC GGC TCG AAC ATC GCG CTG TTG AAT GCG ATG GGC CAT GAT

1448
Ile Ile Glu Glu Asn Leu Tyr Asp Lys Ala Phe Val Ala Ser Arg Thr Glu Gly Phe Glu
ATT ATT GAA GAA AAT CTG TAC GAC AAA GCG TTC GTC GCT TCA CGT ACA GAA GGC TTT GAA

1508
Glu Tyr Arg Lys Ile Val Glu Gly Tyr Thr Pro Glu Ser Val Glu Asp Ile Thr Gly Val
GAG TAT CGT AAA ATC GTT GAA GGC TAC ACG CCG GAG TCG GTT GAA GAT ATC ACC GGC GTC

1568
Ser Ala Ser Glu Ile Arg Gln Ala Ala Arg Met Tyr Ala Lys Ser Ala Ala Ile
AGC GCC AGT GAG ATT CGT CAG GCG GCA CGG ATG TAT GCC CAG GCG AAA AGC GCC ACC ATC

1628
Leu Trp Gly Met Gly Val Thr Gln Phe Tyr Gln Gly Val Glu Thr Val Arg Ser Leu Thr
CTG TGG GGC ATG GGT GTA ACC CAG TTC TAC CAG GGC GTG GAA ACC GTG CGT TCT CTG ACC

1688
Ser Leu Ala Met Leu Thr Gly Asn Leu Gly Lys Pro His Ala Gly Val Asn Pro Val Arg
AGC CTC GCG ATG CTG ACC GGT AAC CTC GGT AAG CCG CAT GCG GGT GTT AAC CCG GTT CGT

```

1748
Gly Gln Asn Asn Val Gln Gly Ala Cys Asp Met Gly Ala Leu Pro Asp Thr Tyr Pro Gly
GGT CAG AAC AAC GTT CAG GGT GCC TGC GAT ATG GGC GCG CTG CCG GAT ACG TAT CCG GGA
1808
Tyr Gln Tyr Val Lys Asp Pro Ala Asn Arg Glu Lys Phe Ala Lys Ala Trp Gly Val Glu
TAC CAG TAC GTG AAA GAT CCG GCT AAC CGC GAG AAA TTC GCC AAA GCC TGG GGC GTG GAA
1868
Ser Leu Pro Ala His Thr Gly Tyr Arg Ile Ser Glu Leu Pro His Arg TGA Ala His Gly
AGC CTG CCA GCG CAT ACC GGC TAT CGC ATC AGC GAG CTG CCG CAC GCG GCA GCG CAT GGC
1928
Glu Val Arg Ala Ala Tyr Ile Met Gly Glu Asp Pro Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Ser
GAA GTG CGT GCC GCG TAC ATT ATG GGC GAA GAT CCG CTA CAA ACT GAC GCG GAG CTG TCG
1988
Ala Val Arg Lys Ala Phe Glu Asp Leu Glu Leu Val Ile Val Gln Asp Ile Phe Met Thr
GCA GTA CGT AAA GCC TTT GAA GAT CTG GAA CTG GTT ATC GTT Gln Asp ALC TTT ATG ACC
2048
Lys Thr Ala Ser Ala Ala Asp Val Ile Leu Pro Ser Thr Ser Trp Gly Glu His Glu Gly
AAA ACC GCG TCG GCG GCG GAT GTT ATT TTA CCG TCA ACG TCG TGG GGC GAG CAT GAA GGC
2108
Val Phe Thr Ala Ala Asp Arg Gly Phe Gln Arg Phe Phe Lys Ala Val Glu Pro Lys Trp
GTG TTT ACT GCG GCT GAC CGT GGC TTC CAG CGT TTC AAG GCG GTT GAA CCG AAA TGG
2168
Asp Leu Lys Thr Asp Trp Gln Ile Ile Ser Glu Ile Ala Thr Arg Met Gly Tyr Pro Met
GAT CTG AAA ACG GAC TGG CAA ATC ATC AGT GAA ATC GCC ACC CGT ATG GGT TAT CCG ATG
2228
His Tyr Asn Asn Thr Gln Glu Ile Trp Asp Glu Leu Arg His Leu Cys Pro Asp Phe Tyr
CAC TAC AAC AAC ACC CAG GAG ATC TGG GAT GAG TTG CGT CAT CTG TGC CCG GAT TTC TAC
2288
Gly Ala Thr Tyr Glu Lys Met Gly Glu Leu Gly Phe Ile Gln Trp Pro Cys Arg Asp Thr
GGT GCG ACT TAC GAG AAA ATG GGC GAA CTG GGC TTC ATT CAG TGG CCT TGC CCG GAT ACT
2348
Ser Asp Ala Asp Gln Gly Thr Ser Tyr Leu Phe Lys Glu Lys Phe Asp Thr Pro Asn Gly
TCA CAT GCC CAT CAG GGG ACT TCT TAT CTG TTT AAA GAG AAG TTT GAT ACC CCG AAC GGT
2408
Leu Ala Gln Phe Phe Thr Cys Asp Trp Val Ala Pro Ile Asp Lys Leu Thr Asp Glu Tyr
CTG GCG CAG TTC TTC ACC TGC GAC TGG GTA GCG CCA ATC GAC AAA CTC ACC GAC GAG TAC
2468
Pro Met Val Leu Ser Thr Arg Glu Glu Val Gly His Tyr Ser Cys Arg Ser Met Thr Gly
CCG ATG GTA CTG TCA ACG GTG CGT GAA GTT GGT CAC TAC TCT TCG CGT TCG ATG ACC GGT
2528
Asn Cys Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asp Glu Pro Gly Tyr Ala Gln Ile Asn Thr Glu
AAC TGT GCG GCA CTG GCG GCG CTG GCT GAT GAA CCT GGC TAC GCA CAA ATC AAT ACC GAA
2588
Asp Ala Lys Arg Leu Gly Ile Glu Asp Glu Ala Leu Val Trp Val His Ser Arg Lys Gly
GAC GCC AAA CGT CTG GGT ATT GAA GAT GAG GCA TTG GTT TGG GTG CAC TCG CGT AAA GGC
2648
Lys Ile Ile Thr Arg Ala Gln Val Ser Asp Arg Pro Asn Lys Gly Ala Ile Tyr Met Thr
AAA ATT ATC ACC CGT GCG CAG GTC AGC GAT CGT CCG AAC AAA GGG GCG ATT TAC ATG ACC
2708
Tyr Gln Trp Trp Ile Gly Ala Cys Asn Glu Leu Val Thr Glu Asn Leu Ser Pro Ile Thr
TAC CAG TGG TGG ATT GGT GCC TGT AAC GAG CTG GTT ACC GAA AAC TTA AGC CCG ATT ACG
2768
Lys Thr Pro Glu Tyr Lys Tyr Cys Ala Val Arg Val Glu Pro Ile Ala Asp Gln Arg Ala
AAA ACG CCG GAG TAC AAA TAC TGC GCC GTT GCG GTC GAG CCG ATC GCC GAT CAG GCG GCC
2828
Ala Glu Gln Tyr Val Ile Asp Glu Tyr Asn Lys Leu Lys Thr Arg Leu Arg Glu Ala Ala
GCC GAG CAG TAC GTG ATT CAG GAG TAC AAC AAG TTG AAA ACT CGC CTG GCG GAA GCG GCA
2888
Leu Ala ### TACCGTCCTTTCTACAGCCTCCTTCGAGGCTGTTTTTTTATCCATTGCAACTCTTTATACTGGTT
CTG GCG TAA

```

Abbildung 9:

Nucleotidsequenz des *fdhF* Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Genprodukts. Dargestellt ist die Sequenz des RNA-gleichen DNA-Stranges von 5' nach 3'. Die Numerierung beginnt am zweiten Guanosinrest der *SmaI*-Stelle. Die Ribosomenbindestelle ist unterstrichen, das UGA Codon im Leseraster von *fdhF* ist eingerahmt. Palindrome und "inverted repeats" sind durch horizontale Pfeile dargestellt.

Tabelle 9: Aminosäurezusammensetzung des fdhF Genprodukts

Aminosäure		Anzahl	Mol%	Durchschnitt in E. coli (Mol%) (47)
Ala	A	76	10.63	8.6
Cys	C	15	2.10	2.9
Asp	D	39	5.45	5.5
Glu	E	48	6.71	6.0
Phe	F	20	2.80	3.6
Gly	G	54	7.55	8.4
His	H	15	2.10	2.0
Ile	I	44	6.15	4.5
Lys	K	39	5.45	6.6
Leu	L	44	6.15	7.4
Met	M	18	2.52	1.7
Asn	N	35	4.90	4.3
Pro	P	31	4.34	5.2
Gln	Q	27	3.78	3.9
Arg	R	38	5.31	4.9
Ser	S	32	4.48	7.0
Thr	T	45	6.29	6.1
Val	V	50	6.99	6.6
Trp	W	13	1.82	1.3
Tyr	Y	31	4.34	3.4
Xxx	Z (UGA)	1	0.14	0.0

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der verwendeten Codons in fdhF

UUU	Phe	7	UCU	Ser	3	UAU	Tyr	10	UGU	Cys	3
UUC	Phe	13	UCC	Ser	3	UAC	Tyr	21	UGC	Cys	12
UUA	Leu	3	UCA	Ser	5	UAA	Och	1	UGA	Xxx	1
UUG	Leu	4	UCG	Ser	10	UAG	Amb	0	UGG	Trp	13
CUU	Leu	0	CCU	Pro	3	CAU	His	6	CGT	Arg	22
CUC	Leu	4	CCC	Pro	2	CAC	His	9	CGC	Arg	14
CUA	Leu	1	CCA	Pro	4	CAA	Gln	5	CGA	Arg	0
CUG	Leu	32	CCG	Pro	22	CAG	Gln	22	CGG	Arg	2
AUU	Ile	21	ACU	Thr	6	AAU	Asn	9	AGU	Ser	2
AUC	Ile	23	ACC	Thr	28	AAC	Asn	26	AGC	Ser	9
AUA	Ile	0	ACA	Thr	1	AAA	Lys	33	AGA	Arg	0
AUG	Met	18	ACG	Thr	10	AAG	Lys	6	AGG	Arg	0
GUU	Val	20	GCU	Ala	8	GAU	Asp	26	GGU	Gly	22
GUC	Val	13	GCC	Ala	21	GAC	Asp	13	GGC	Gly	26
GUA	Val	6	GCA	Ala	13	GAA	Glu	26	GGA	Gly	1
GUG	Val	11	GCG	Ala	34	GAG	Glu	22	GGG	Gly	5

Noch weiter stromaufwärts befindet sich ein zusätzlicher Leserahmen, der an Position 228 mit einem AUG Codon beginnt und an Position 549 mit einem UAA Codon endet. Er kodiert für ein Protein mit 107 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 12 kDa. Es fehlt jedoch eine Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem AUG Codon, was die Translation in ein Protein unwahrscheinlich macht. Wie Komplementationsversuche mit dem Plasmid pFM26 (Abb. 5) ergaben, ist dieser Leserahmen für die Expression des FDH_H -Selenoproteins ohne Bedeutung.

Der Start der Transkription des fdhF Gens läßt sich auf der DNA-Sequenz des 5' flankierenden Bereiches nicht ableiten, da E. coli-typische Promotorsequenzen (Region "-10" und Region "-35") fehlen (76, 133). Die Anwesenheit des fdhF Promotors konnte aber mit Hilfe von fdhF-lacZ Fusionen nachgewiesen werden (A. Birkmann, pers. Mitteilung). Im Bereich zwischen den Positionen 560 und 730 finden sich zahlreiche Strukturen von Palindromen und "inverted repeats". Ihre biologische Bedeutung für die Expression und die Regulation des fdhF Gens muß aber erst nachgewiesen werden.

Dem Ende des offenen Leserahmens von fdhF folgt im Abstand von 13 bp zum UAA Stopcodon eine palindrom-artige Sequenz, wie sie für rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren in E. coli typisch ist (133).

4. Analyse der Selenopolypeptide in Plasmidklonen mit Deletionen im fdhF Gen

Da bei der Sequenzierung des fdhF Gens ein UGA Stoppcodon mitten im offenen Leserahmen gefunden wurde, mußte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß fdhF für andere Genprodukte als das 80 kDa FDH_H -Selenopeptid kodiert. Aus der Tatsache, daß in verkürzte fdhF Genprodukte Selen eingebaut wird, ergab sich eine einfache Möglichkeit zu beweisen, daß fdhF das Strukturgen des 80 kDa Selenoproteins darstellt. In diesem Fall mußte das Verkürzen des Gens vom promotor-distalen Ende her zu verkürzten Selenopolypeptiden führen, deren Längen mit denen der jeweiligen offenen Leserahmen strikt korrelieren. Die Plasmide aus dem Verkürzungsexperiment mit Bal31 eigneten sich deshalb sehr gut, um diese Frage experimentell anzugehen. Von den neun Plasmiden pFM30-pFM38 war in allen Fällen die Länge des jeweiligen fdhF Genfragments genau kartiert und in einigen Fällen sequenziert.

Es erwies sich dabei als günstig, daß im kodierenden Strang des Tc-Resistenzgens von pACYC184 (von 5' nach 3' gelesen), etwa 20 bp von der BamHI-Stelle entfernt, auf einer Länge von 20 bp in allen drei Rastern Stoppcodons auftreten (28, 170). Durch die gegenläufigen Ableserichtungen des fdhF Gens und des (verbliebenen Teils des) Tc-Resistenzgens in pFM20 und seinen Derivaten pFM30-pFM38 (siehe Abb. 7) wird der kodierende DNA-Strang des Tc-Resistenzgens zum RNA-gleichen Strang bei der Transkription von fdhF. Unmittelbar an der Fusionsstelle stoppt deshalb auf einer Länge von 20 bp in jedem Fall die Translation von fdhF. Aus diesem Grund sind die Längen der jeweils synthetisierten Selenopolypeptide in den Plasmidklonen mit pFM30-pFM38 direkt vergleichbar.

Als Alternative zu terminalen Deletionen in fdhF bot es sich an, mit Hilfe der bekannten Sequenzdaten kleine interne Deletionen in fdhF zu erzeugen und zu untersuchen, ob die Länge der resultierenden Selenopolypeptide mit den neugeschaffenen offenen Leserahmen korreliert. In drei Ansätzen wurde deshalb DNA von pFM20 mit den Enzymen KpnI, BglII und PvuI gespalten und anschließend religiert. In pFM23 kam es dadurch zum Verlust eines 270 bp KpnI-Fragments, in pFM24 fehlte ein 239 bp BglII-Fragment und in pFM25 umfaßte die Deletion ein 134 bp PvuI-Fragment. Während in pFM23 der Leseraster erhalten blieb, führten die Deletionen in pFM24 und pFM25 zu Rasterschüben. Infolgedessen kommt es bei der Translation zu vorzeitiger Termination (pFM24: UGA, bp 2257-2259; pFM25: UGA, bp 2845-2847) (vgl. Abb. 9).

Zur Konstruktion von pFM22 wurde pFM20 DNA mit EcoRV und XbaI gespalten. Nach Auffüllen der Enden mit DNA-Polymerase I wurde das 3.9 kb EcoRV-XbaI Fragment wieder religiert. Es entstand dabei an der Fusionsstelle neben der erhaltenen XbaI-Stelle eine zusätzliche BglII-Stelle. pFM22 enthält also nur mehr den promotor-proximalen Teil von fdhF mit 268 Codons, fusioniert mit einem artifiziellen Leserahmen im Replikationsbereich des Vektors pACYC184 mit zusätzlichen 24 Codons (153) (Abb. 10).

In Markierungsexperimenten mit ⁷⁵Se-Selenit wurde anschließend untersucht, welche Selenopolypeptide von FM911 in Anwesenheit der verschiedenen Plasmide synthetisiert wurden. Die Autoradiogramme sind in den Abbildungen 11 A und 11 B zu sehen. Wie schon im vorhergegangenen Markierungsversuch waren die Banden der verkürzten Selenopolypeptide deutlich schwächer ausgeprägt als die des 80 kDa Wildtypproteins; wahrscheinlich kommt es also zu einem raschen Abbau durch zelleigene Proteasen.

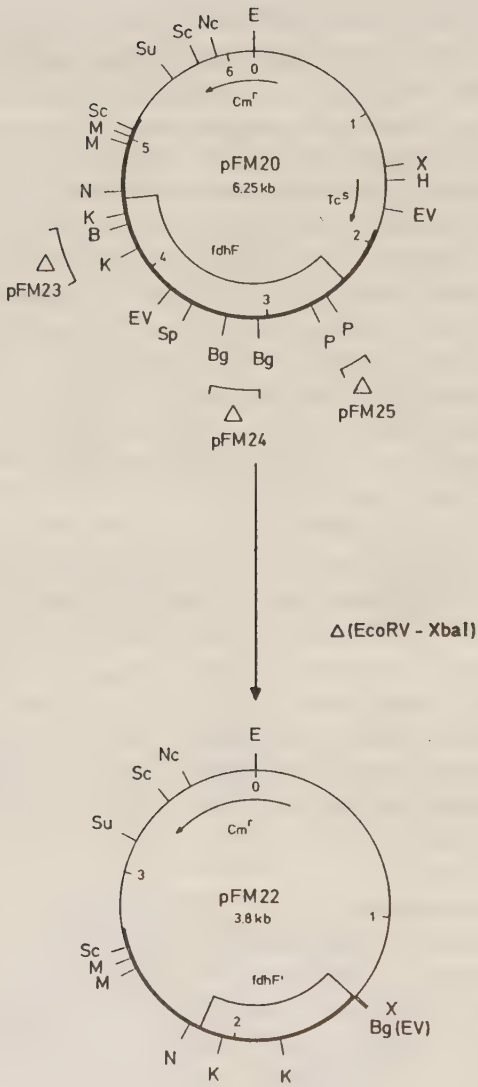
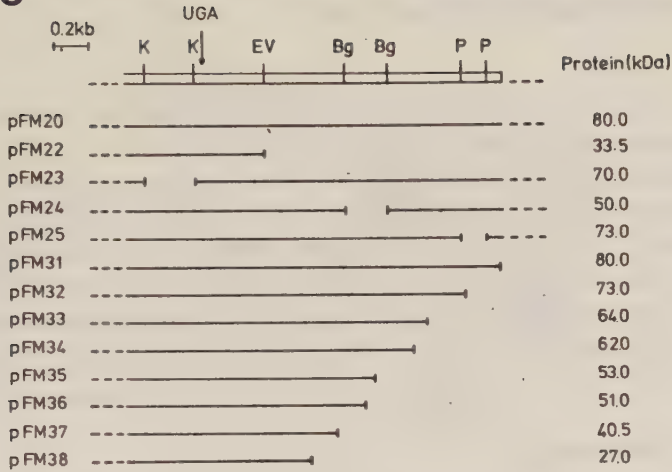


Abbildung 10: Konstruktion der Plasmide pFM22-pFM25.

C



D

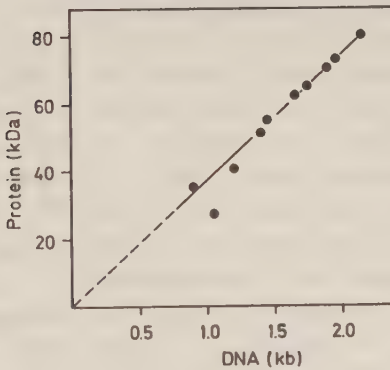
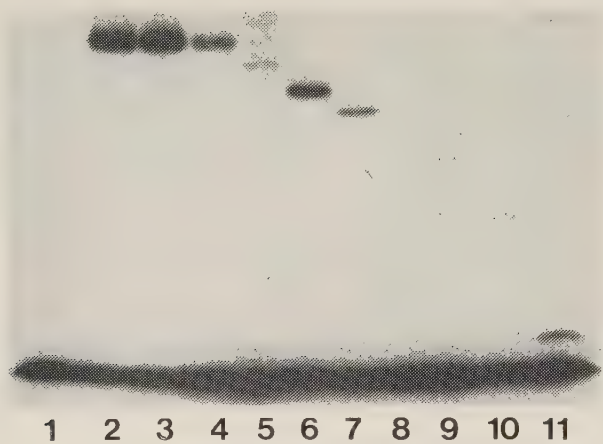


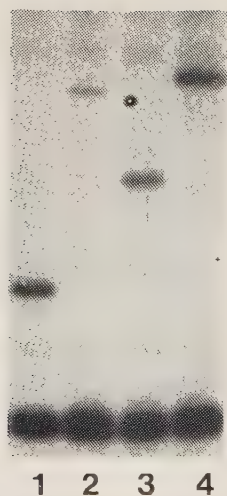
Abbildung 11:

(A) und (B) Autoradiogramme von SDS-Extrakten ^{75}Se -Selenit markierter Zellen von FM911 mit verschiedenen Plasmiden.
 (C) Restriktionskarten der Plasmide mit in vitro erzeugten Deletionen in fdhF.
 (D) Relation zwischen den Größen der offenen Leserahmen und den Größen der Selenopolypeptide.

A



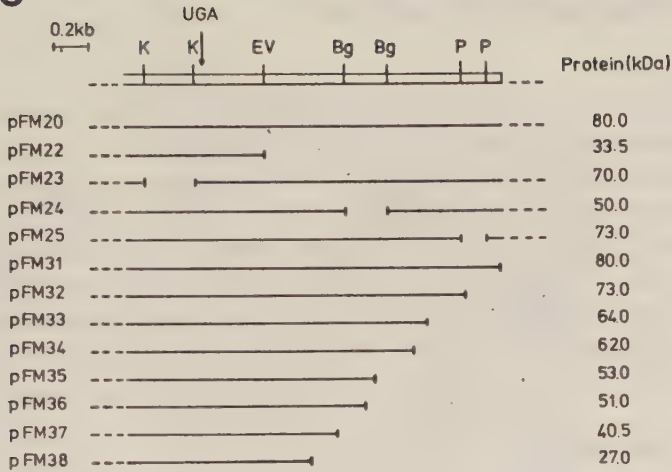
B



(A) Spur 1: pACYC184
Spur 2: pFM20
Spur 3-11: pFM30-pFM38

(B) Spur 1-4: pFM22-pFM25

C



D

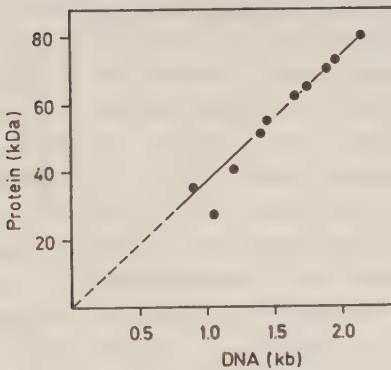


Abbildung 11:

(A) und (B) Autoradiogramme von SDS-Extrakten ⁷⁵Se-Selenit markierter Zellen von FM911 mit verschiedenen Plasmiden.
 (C) Restriktionskarten der Plasmide mit in vitro erzeugten Deletionen in fdhF.
 (D) Relation zwischen den Größen der offenen Leserahmen und den Größen der Selenopolypeptide.

5. Rückhybridisierung der klonierten DNA - Segmente mit chromosomaler DNA aus *E. coli*

Mit Hilfe von DNA-Hybridisierungsexperimenten wurde die Struktur des chromosomalen fdhF Genlocus untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Deletion, die Mu dI bei der Exzision in FM909 zurückgelassen hatte. Mit dem klonierten fdhF Gen als Probe wurde deshalb mit chromosomaler DNA des Elternstammes MC4100 und der Mutante FM909 hybridisiert. Außerdem wurde die Insertionsstelle von Mu dI im fdhF Gen der Mutante M9s mittels Hybridisierung kartiert.

a) Wildtyp

Neben Untersuchungen zur genomischen Umgebung des fdhF Gens stand auch der Nachweis an, daß es während der Klonierung des fdhF Gens nicht zu Umlagerungen in der DNA gekommen war. 10 µg chromosomale DNA aus MC4100 (fdhF⁺) und 0.25 µg Plasmid-DNA von pFM3 wurden jeweils mit BamHI, EcoRV und MluI gespalten. Die Fragmente wurden auf einem 0.6 % Agarosegel aufgetrennt und danach auf einem NC-Filter transferiert ("Southern blot"). Das 6.2 kb BamHI-Insert aus pFM3 wurde durch "nick translation" mit ³²P markiert und als Probe verwendet. Abbildung 12 zeigt das Autoradiogramm des NC-Filters nach der Hybridisierung. Die Hybridisierungsmuster mit Fragmenten sowohl aus chromosomaler DNA wie aus Plasmid DNA sind in allen Fällen identisch, Klonierungsartefakte wie Rearrangements können deshalb ausgeschlossen werden.

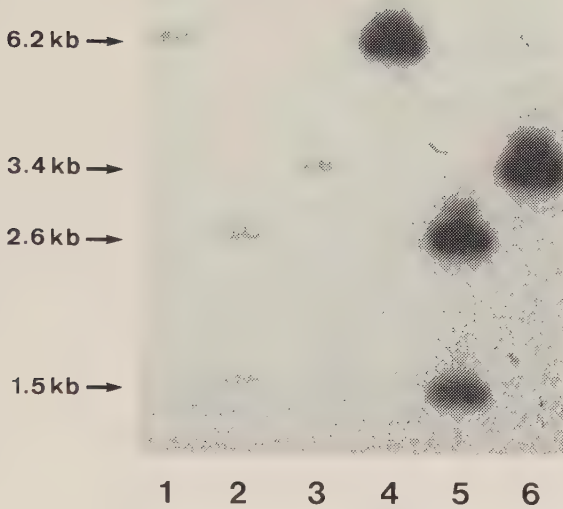


Abbildung 12:

Autoradiogramm nach Rückhybridisierung des klonierten fdhF Gens mit chromosomaler DNA aus MC4100.

DNA aus MC4100, gespalten mit BamHI (Spur 1), EcoRV (Spur 2) und MluI (Spur 3); DNA des Plasmids pFM3, gespalten mit BamHI (Spur 4), EcoRV (Spur 5) und MluI (Spur 6).

b) Mutante mit Mu-Insertion in fdhF

Die Insertionsstelle des Mu dl(Ap^rlac) Phagen im fdhF Gen des Stammes M9s wurde durch Hybridisierung mit spezifischen lacZ und fdhF Proben kartiert. Es wurde dabei untersucht, welche Fragmente chromosomaler DNA aus M9s gleichzeitig mit beiden Proben hybridisierten.

Je zweimal 10 µg chromosomale DNA von M9s wurden mit BamHI, BglII, BstEII und SacI gespalten. Die Fragmente wurden in zwei Sätzen à 4 Spuren auf einem 0.6 % Agarosegel aufgetrennt und danach auf einen NC-Filter transferiert. Der Filter wurde geteilt und parallel mit zwei verschiedenen Proben hybridisiert. Als interne fdhF Probe diente ein 1.55 kb KpnI-BamHI Fragment aus pFM32 (Codon 130-645 in fdhF), als interne lacZ Probe wurde ein 3.0 kb großes BamHI-EcoRI Fragment aus pMC874 (Codon 9-1016 in lacZ) eingesetzt. In Abbildung 13 ist das Autoradiogramm des NC-Filters und eine schematische Darstellung der Mu-Insertion in fdhF, zusammen mit den verwendeten Hybridisierungsproben zu sehen.

Ein Teil der Fragmente genomischer DNA aus M9s hybridisierte mit beiden Proben (BamHI: 12.2 kb; BglII: 8.6 kb; BstEII: 8.2 und 4.3 kb; SacI: > 30 kb). Auf der Basis der bekannten Restriktionskarten von fdhF und Mu dl (Ap^rlac) (119) kann daraus abgeleitet werden, daß sich die Insertionsstelle von Mu dl (und damit die Fusionsstelle) in fdhF ungefähr bei Position 2400 (vgl. Abb. 9) befindet. Die Tatsache, daß ein 4.3 kb BstEII Fragment mit fdhF und lacZ hybridisierte, ist mit den Restriktionskarten nicht leicht zu vereinbaren. Das Signal war jedoch sehr schwach; eventuell wurde das Fragment durch eine kontaminierende Endonuklease-Aktivität in der BstEII-Präparation erzeugt, wobei eine Stelle in lac erkannt wurde.

Andere Fragmente chromosomaler DNA hybridisierten dagegen spezifisch nur mit der fdhF Probe. Das waren zum einen Fragmente stromauf der Mu-Insertion im fdhF Gen und in dessen 5' flankierenden Bereich (BglII: 6.4 kb; BstEII: 3.7 kb). (Das 0.24 kb BglII Fragment war jedoch bereits aus dem Gel herausgewandert.) Zum anderen hybridisierten Fragmente unmittelbar am promotor-distalen Ende des inserierten Mu-Phagen (BamHI: 17.5 kb; BglII: 12 kb; BstEII: 3.9 kb; SacI: >30 kb). Da der hybridisierende Bereich der fdhF Probe dort nur etwa 300 Nucleotide lang war, ergaben sich entsprechend etwas schwächere Signale auf dem Autoradiogramm.

Überraschenderweise war die Länge des hybridisierenden BstEII Fragments nur 3.9 kb statt der erwarteten 12.8 kb; dafür bietet sich aber eine einfache Erklärung an: M9s besitzt eine "stabilisierte" lac Fusion (126), der Mu-Prophage in fdhF verhält sich genetisch wie eine Mu-X Mutante (5, 29) und enthält wahrscheinlich eine IS₁ Insertion im Gen B (30, 48). Die Analyse der bekannten DNA-Sequenz von IS₁ (121) ergab zwar eine BstEII-Stelle, aber keine Stellen für BamHI und BglII. Bei einem Abstand von 3.3 kb zum c-Ende von Mu (29) ergibt sich rechnerisch eine Größe von 4 kb statt 12.8 kb für ein BstEII Fragment, das mit der fdhF Probe hybridisiert, während die Größen der hybridisierenden BamHI und BglII Fragmente um 0.77 kb zunehmen. Genau dieses Muster aber wurde bei der Hybridisierung gefunden.

c) Mutante mit Deletion von fdhF

Um das Ausmaß der Deletion festzustellen, die Mu dI bei der Exzision in FM909 hinterlassen hatte, wurde ebenfalls der Weg über die DNA-Hybridisierung gewählt.

Je 10 µg chromosomale DNA aus MC4100 und FM909 wurden mit den Enzymen BamHI, KpnI, BglII, EcoRI, PstI und SalI gespalten. Die Fragmente wurden auf einem 0.6 % Agarosegel

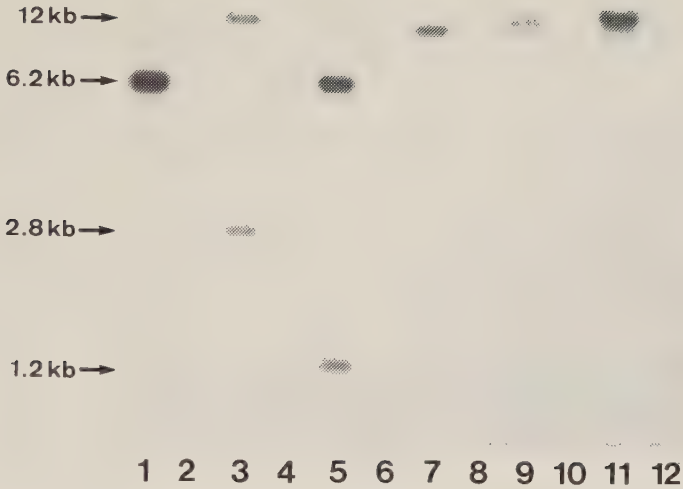


Abbildung 14:

Hybridisierungsanalyse der chromosomalen *fdhF* Region in MC4100 (*fdhF*⁺) und FM909 (Δ *fdhF*).

Chromosomale DNA aus MC4100 (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11) und FM909 (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12), gespalten mit BamHI (1, 2), KpnI (3, 4), BglIII (5, 6) EcoRI (7, 8), PstI (9, 10), SalI (11, 12).

aufgetrennt und auf NC-Filter transferiert. Als Probe diente das 6.2 kb BamHI-Insert aus pFM3, welches das fdhF Gen enthält. In Abbildung 14 ist das Resultat der Hybridisierung zu sehen. Entscheidend ist, daß die Probe in keinem einzigen Fall mit chromosomalen DNA-Fragmenten aus der Mutante FM909 hybridisierte. Die Deletion umfaßt also mindestens 6.2 kb und damit das gesamte fdhF Gen. Da keine größeren bzw. benachbarten DNA-Fragmente als Probe zur Verfügung standen, können darüber hinaus keine genaueren Angaben zur Größe der Deletion gemacht werden.

In chromosomaler DNA von MC4100 hybridisierten von den EcoRI-, PstI- und SalI-Fragmenten nur solche mit 12 bis 20 kb. Unter den KpnI-Fragmenten hybridisierten zwei Fragmente mit 2.8 kb und 12 kb. Das kleine 0.27 kb Fragment in fdhF war schon aus dem Gel hinausgelaufen. Dasselbe gilt auch für das 0.24 kb BglII-Fragment in fdhF. Ansonsten hybridisierten drei andere BglII-Spaltstücke mit 1.15 kb, 6.4 kb und ca. 15 kb. Von den BamHI-Fragmenten hybridisierte nur eines mit 6.2 kb. Die Ergebnisse der Hybridisierung entsprechen also denen der Restriktionskartierung des 6.2 kb BamHI-Fragments im Plasmid pFM3.

6. Reklonierung von fdhF mittels DNA - Hybridisierung und erneute Sequenzierung der DNA-Fragmente

a) Klonierung

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß das UGA Codon die Folge eines Klonierungsartefakts darstellt, wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Beide Ansätze sollten gewährleisten, daß keine Gegenselektion auf ein mutiertes fdhF Gen erfolgt. Zum einen wurde das intakte fdhF Gen unter aeroben (reprimierenden) Bedingungen kloniert, zum anderen wurde ein inaktives Genfragment kloniert. Die gewünschten Klone wurden rein physikalisch durch DNA-Hybridisierung identifiziert.

Im ersten Ansatz wurde chromosomale DNA von MC4100 mit BamHI gespalten. Es wurden Fragmente einer Größe von etwa 6 kb isoliert und in pBR322 kloniert. Nach Transformation in den Stamm DH1 konnten im Rahmen einer Koloniehybridisierung unter 400 Rekombinanten zwei positive Klone identifiziert werden, deren Plasmide mit dem als Probe eingesetzten 1.15 kb BglII Fragment aus pFM3 (vgl. Abb. 4) hybridisierten. Beide Plasmide enthielten wie pFM3 ein 6.2 kb BamHI Fragment und konnten die Deletion in FM911 komplementieren.

Im zweiten Ansatz wurde chromosomale DNA von MC4100 mit KpnI und BamHI gespalten. Es wurden Fragmente einer Größe von etwa 3.7 kb isoliert und in pUC18 kloniert. Aus der Sequenzierung des fdhF Gens war bekannt, daß ein 3.7 kb KpnI-BamHI Fragment den promotor-distalen Teil des fdhF Gens enthält (Codon 130-715, das UGA Codon ist an Position 140). Da die Fusion des lacZ Gens des Vektors pUC18 und des fdhF Genfragments zu einem Rasterschub führte, konnte auch kein Fusionsprotein mit unerwünschten Eigenschaften entstehen. Die Transformation erfolgte in den recA-positiven Stamm JM101. Durch mögliche Rekombination zwischen dem klonierten und dem chromosomalen fdhF Gen des Wirtsstammes

sollte das Auftreten von Mutationen im klonierten Genfragment minimiert werden. Unter 400 Rekombinanten wurden durch Koloniehybridisierung mit dem 1.15 kb BglII-Fragment acht positive Klone identifiziert, die alle ein 3.7 kb KpnI-BamHI Fragment enthielten.

b) Sequenzierung

Von je einem Plasmid aus beiden Ansätzen wurde die DNA-Sequenz ausgehend von der KpnI-Stelle (Position 1133-1135 in Abb. 9) bestimmt. In beiden Fällen war die DNA-Sequenz identisch mit der bereits bekannten Sequenz von fdhF, auch die Existenz des UGA Codons konnte bestätigt werden. Damit ist ausgeschlossen, daß das interne UGA Codon in fdhF die Folge eines Klonierungsartefakts darstellt.

7. Expressionsanalyse des plasmidkodierten fdhF Gens

a) Maxizellen

Als Alternative zum Minizellsystem (33) wurde von Sancar die Maxizellmethode (140, 141) zum Nachweis plasmidkodierter Proteine entwickelt. Sie basiert auf der Beobachtung, daß es in recA Mutanten nach Bestrahlung mit UV-Licht zum extensiven Abbau der beschädigten chromosomalen DNA kommt (32). Mutanten mit zusätzlichen Defekten in uvrA und phr (z.B. CSR603) werden aufgrund des Ausfalls aller DNA-Reparatursysteme (140) bereits durch geringe Dosen an UV-Licht geschädigt und sind deshalb prinzipiell am besten für Maxizellversuche geeignet. Da unbeschädigt gebliebene Plasmide mit ColEI-Replicon in Maxizellen amplifiziert werden, resultiert daraus eine stark erhöhte Kopienzahl der klonierten Gene, was den Nachweis der Genprodukte erleichtert. Der Nachweis geschieht in Form der radioaktiven Markierung mit ^{35}S -Methionin, das von den Zellen in vivo in Proteine eingebaut wird. Nach Gelelektrophorese der Maxizellextrakte lassen sich die markierten Proteine auf Autoradiogrammen sichtbar machen.

Als Bestätigung der ^{75}Se -Markierungsversuche, in denen fdhF als Strukturgen des 80 kDa FDH_H -Selenoproteins identifiziert wurde, sollte im Maxizellsystem durch Markierung mit ^{35}S -Methionin die Synthese dieses Proteins gezeigt werden. Außerdem stellte sich die Frage, ob auf dem 6.2 kb Insert im Plasmid pFM3 noch andere Gene vorhanden waren.

Die ersten Versuche wurden nach der Beschreibung von Sancar (140) mit dem Stamm CSR603 durchgeführt, der als Wirt für die Plasmide pACYC184 und pFM3 diente. CSR603 erwies sich aber als ungeeignet. Das äußerst langsame anaerobe Wachstum der Kulturen wurde noch zusätzlich durch die unzureichende pH-Pufferkapazität des M9-Minimalmediums beeinträchtigt.

In der zweiten Versuchsserie wurde vor allem versucht, eine spezifische Synthese des 80 kDa Selenoproteins in Maxizellen zu erreichen. Aus dem 6.2 kb Fragment wurde deshalb nur das zentrale Segment mit dem sequenzierten fdhF Gen in einen anderen Vektor umgesetzt. Dazu wurde aus pFM30 ein 3.9 kb EcoRI-BamHI Fragment isoliert (vgl. Abb. 7) und in pBR328 kloniert. Das rekombinante Plasmid pFM60 (Abb. 15) hatte eine Größe von 7.2 kb und komplementierte die Mutanten FM1222 und FM911. Aus den entsprechenden Genfragmenten in pBR328 und pACYC184 konnte wieder ein funktionelles Cm-Resistenzgen zusammengefügt werden. pBR328 hat eine drei- bis fünffach höhere Kopienzahl als pACYC184 und kann in recA Stämmen wesentlich besser amplifiziert werden (22, 40). Entsprechend waren auch höhere Einbauraten für ³⁵S-Methionin zu erwarten. Als Wirtsstamm diente FM911, der zwar höhere Bestrahlungs-Dosen mit UV-Licht erforderte, dafür aber zuverlässig wuchs. Als Anzuchtmedium wurde WM-Medium verwendet, das eine zufriedenstellende pH-Pufferkapazität aufwies und gutes Wachstum ermöglichte.

Zunächst wurden in allen Versuchsphasen anaerobe Bedingungen eingehalten, um die Induktion von fdhF sicherzustellen. Wie das Autoradiogramm der Abbildung 16 zeigt, synthetisierten Maxizellen von FM911/pFM60 in der Tat ein Protein von 80 kDa. Diese Bande war in den Extrakten von FM911/pBR328 nicht vorhanden. Zusätzlich sind auch die Banden der Cm-Acetyltransferase (25 kDa) und der β -Lactamase (31 bzw. 29 kDa) auf dem Autoradiogramm sichtbar. Formiat, als Induktor von fdhF (126), wurde in einigen Experimenten kurz vor der Markierung zugesetzt. Es konnte jedoch kein stimulierender Einfluß auf die Synthese des 80 kDa Selenoproteins festgestellt werden (nicht gezeigt).

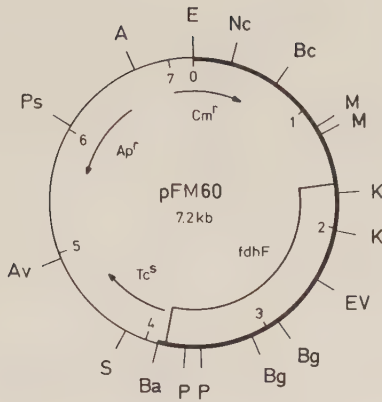


Abbildung 15:

Restriktionskarte des Plasmids pFM60.

Dünne Linie: Anteil des Vektors pBR328; starke Linie: Insert-fragment aus pFM30.

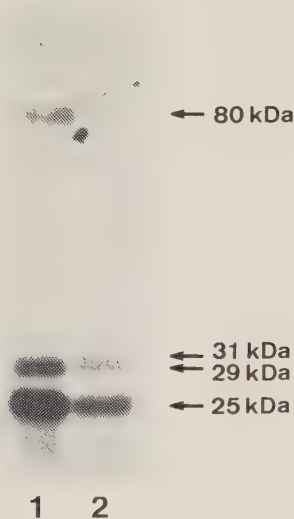


Abbildung 16:

Autoradiogramm ^{35}S -Methionin markierter Maxizell-Extrakte von pFM60 (Spur 1) bzw. pBR328 (Spur 2).

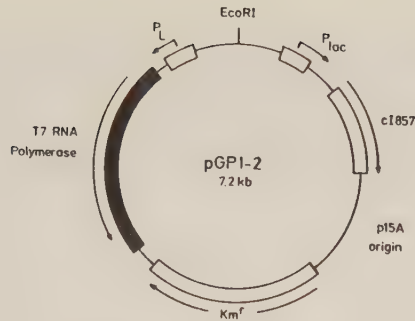
In weiteren Versuchen wurde die Markierung der Maxizellen mit ^{35}S -Methionin in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt. Auch unter aeroben Bedingungen wurde das 80 kDa Selenoprotein gebildet. Dabei war es ohne Bedeutung, ob die Zellen vor der Bestrahlung mit UV-Licht aerob oder anaerob gewachsen waren (nicht gezeigt). Da also die Synthese des 80 kDa FDH_H -Proteins in Maxizellen nicht durch Sauerstoff reguliert war und Formiat keine weitere Induktion bewirkte, scheinen Promotoren des Vektors pBR328 für die Expression von fdhF verantwortlich zu sein. In erster Linie kommt dafür der starke Promotor des Cm-Resistenzgens in Frage, der sich in pFM60 stromauf vor fdhF befindet.

b) T7 RNA Polymerase/Promotor System

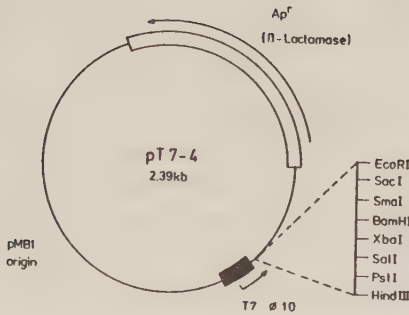
Dieses System bietet eine Alternative zu Maxizellen, um plasmidkodierte Proteine spezifisch zu exprimieren und nachzuweisen (171). Kernstück des Systems ist die RNA-Polymerase des Phagen T7, die sich in zwei wichtigen Eigenschaften von der RNA-Polymerase aus *E. coli* unterscheidet. Zum einen besitzt sie eine extrem hohe Erkennungsspezifität für T7-eigene Promotoren, die ihrerseits wiederum nicht vom *E. coli*-Enzym erkannt werden. Zum anderen ist das Phagenenzym im Gegensatz zum bakteriellen Enzym resistent gegen Rifampicin (171).

Das Expressionssystem besteht aus zwei kompatiblen Plasmiden, die zusammen in einer Zelle koexistieren. Das Plasmid pGP1-2 (mit dem Replikon von p15A) trägt das Gen für den thermolabilen λ -Repressor cI857 und das T7 Gen 1 für die RNA-Polymerase (unter Kontrolle des λ -Promotors P_L). Das Promotorplasmid pT7-4 (mit dem Replikon von pMB1) enthält den T7 Promotor $\phi 1Q$ gefolgt von einem Polylinker zur Klonierung des gewünschten Gens, dessen Produkt nachgewiesen werden soll (Abb. 17).

A



B



C

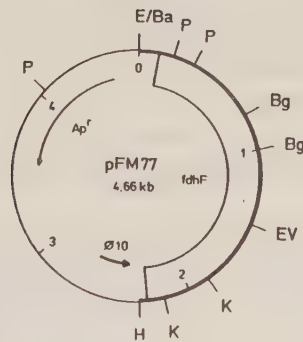


Abbildung 17:

(A) und (B) Schematische Darstellung der Plasmide pGP1-2 und pT7-4.

(C) Restriktionskarte des Plasmids pFM77. Dünne Linie: Anteil des Vektors pT7-4; starke Linie: Insertfragment aus pFM30.

Bei 28°C befindet sich das Expressionssystem im abgeschalteten Zustand. Durch Inkubation der Zellen bei 42°C wird der λ -Repressor inaktiviert, und die Synthese der T7 RNA Polymerase beginnt. Kurz darauf wird die E. coli RNA Polymerase durch Zugabe von Rifampicin inhibiert, und die mRNA der chromosomalen Wirtsgene nimmt entsprechend ihrer Halbwertszeit in der Zelle ab. Das Phagenenzym startet am T7 Promotor ϕ 10 die Transkription des klonierten Gens. In Abwesenheit von Transkriptionsterminatoren auf den pT7 Plasmiden werden von der T7 RNA-Polymerase polycistronische Transkripte gebildet. Die bei der Translation dieser mRNA entstehenden Proteine können durch Zugabe von ^{35}S -Methionin markiert und nach Gelelektrophorese auf Autoradiogrammen sichtbar gemacht werden. Befindet sich das bla Gen auf dem pT7 Vektor in der Orientierung, in der es vom T7 Promotor aus transkribiert werden kann (pT7-4), lassen sich auch die β -Lactamaseproteine auf dem Autoradiogramm nachweisen. Bei inverser Orientierung des bla Gens (pT7-6) unterbleibt jedoch die Bildung der β -Lactamaseproteine.

Mit Hilfe des T7 Expressionssystems wurde ergänzend zu den beschriebenen Maxizellversuchen der Nachweis erbracht, daß fdhF für ein 80 kDa Protein kodiert. Es wurde außerdem gezeigt, daß dieses Protein unabhängig von der Art der Markierung, ob mit ^{35}S -Methionin oder mit ^{75}Se -Selenit, im SDS-Polyacrylamidgel an identischer Position wandert.

Dazu wurde ein 2.3 kb NsiI-BamHI Fragment mit dem fdhF Gen aus pFM30 (Abb. 7) isoliert und in die Vektoren pT7-4 bzw. pT7-6 (gespalten mit PstI und BamHI) kloniert; es entstanden dabei die Plasmide pFM77 und pFM70 (Abb. 17). Das Insert enthielt neben fdhF noch 50 bp des 5' flankierenden und 70 bp des 3' flankierenden Bereichs. Obwohl der fdhF Promotor fehlt (A. Birkmann, pers. Mitteilung), konnte mit pFM70 bzw. pFM77 Komplementation in FM1216 (Δ fdhF) festgestellt werden. Vermutlich sind Plasmidpromotoren für die

Expression verantwortlich. In ^{75}Se -Markierungsversuchen mit FM1216/pFM77 wurde aber nur sehr geringe Synthese des 80 kDa Selenoproteins gefunden (nicht gezeigt). Nach Identifizierung der rekombinanten Plasmide erfolgte im zweiten Schritt die Transformation in den Stamm K38, der bereits das Plasmid pGP1-2 enthielt.

In Abbildung 18 ist das Ergebnis eines Markierungsexperiments mit ^{35}S -Methionin zu sehen. K38/pT7-4 bzw. pFM77 exprimierten nach Induktion mehrere Proteine, die von K38/pFM70 nicht gebildet wurden. Neben der β -Lactamase (31, 29 kDa) wurden auch Proteine mit 17 kDa und 12 kDa auf dem Autoradiogramm sichtbar, die wahrscheinlich Abbauprodukte der β -Lactamase sind. Sowohl pFM70 als auch pFM77 steuerten spezifisch die Synthese zweier Proteine mit 80 kDa und 15 kDa. Die Bande des 80 kDa Proteins zeigte dasselbe Laufverhalten wie die Bande aus einem mit ^{75}Se -markiertem Extrakt von FM420. Das 15 kDa Protein ist wahrscheinlich das Produkt eines Translationsstops am internen UGA Codon (= 139 Aminosäuren) in fdhF. Die Bande dieses Proteins war bedeutend stärker ausgeprägt als die des 80 kDa Proteins, anscheinend stellte das UGA Codon einen Engpass für die Translation dar.

In einem anderen Experiment wurde in analoger Weise eine Markierung mit ^{75}Se -Selenit durchgeführt. Um besseren Einbau zu erzielen, wurde die Markierungsdauer von 5 min auf 60 bzw. 120 min verlängert. Als Vergleich diente ein Extrakt von FM420, der unter Standardbedingungen mit ^{75}Se markiert worden war. Abbildung 19 zeigt das Autoradiogramm dieses Versuchs. K38/pFM77 synthetisierte nach Induktion wie in vorherigen Versuchen mit ^{35}S -Methionin nur geringe Mengen des 80 kDa Selenoproteins, im Vergleich zu FM420 ist die Bande deutlich schwächer ausgeprägt. In den Kontrollkulturen mit K38/pT7-4 wurde kein ^{75}Se in Zellprotein eingebaut, das chromosomale fdhF Gen von K38 war also reprimiert. Etwas überraschend war die Syntheserate des

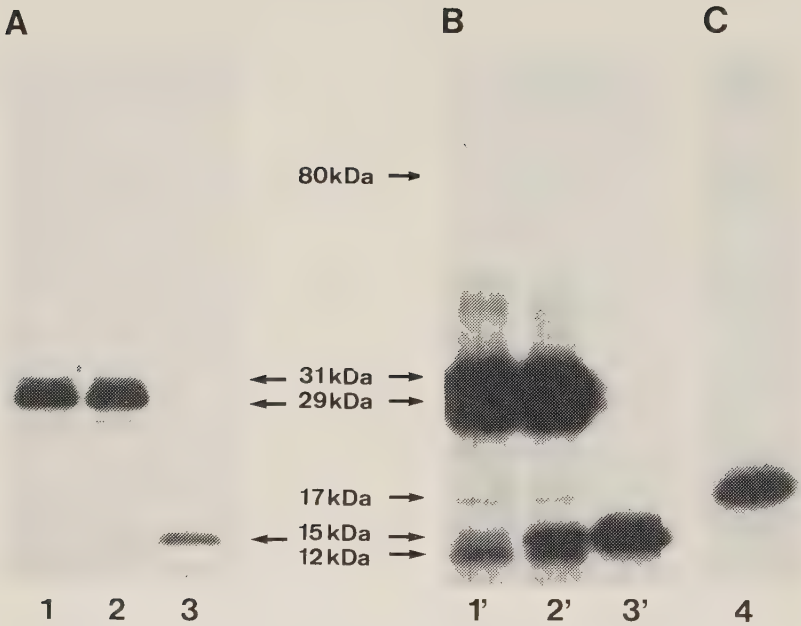


Abbildung 18:

(A) und (B) Autoradiogramme ^{35}S -Methionin markierter Extrakte von K38/pGP1-2 mit verschiedenen pT7-Plasmiden (6 Std. bzw. 24 Std. exponiert).

(C) Autoradiogramm des ^{75}Se -Selenit markierten Extrakts von FM420.

Spur 1: pT7-4

Spur 3: pFM70

Spur 2: pFM77

Spur 4: FM420

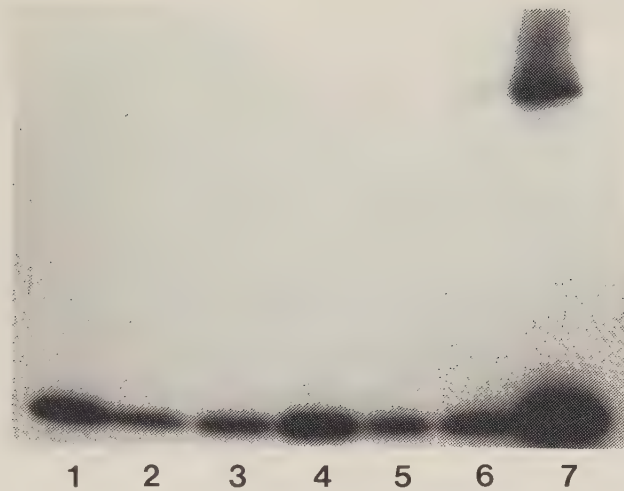


Abbildung 19:

Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte von FM420 und von K38/pGP1-2 mit verschiedenen Plasmiden.

Spur 1-3: pT7-4

Spur 4-6: pFM77

Spur 1, 4: Markierung vor Induktion (60 min lang)

Spur 2, 5: Markierung nach Induktion (60 min lang)

Spur 3, 6: Markierung nach Induktion (120 min lang)

Spur 7: FM420, Markierung bei anaerober Anzucht

80 kDa Selenoproteins vor und nach Induktion gleich hoch. Dieses Phänomen ist auch bei Markierung mit ^{35}S -Methionin zu beobachten, wenn vor der Induktion Rifampicin zugegeben und die Expression chromosomaler Gene verhindert wird (K. Forchhammer, pers. Mitteilung). Es beruht wahrscheinlich auf einer schwachen Hintergrundexpression der T7 RNA-Polymerase bei 30°C. Andererseits nahm der Einbau von ^{75}Se in tRNA-Moleküle infolge der Hemmung der Transkription chromosomaler tRNA-Gene durch Rifampicin deutlich ab.

c) Expression unter Kontrolle des lac Promotors

Die Expression von fdhF ist durch Sauerstoff reguliert (125, 126); das 80 kDa Selenoprotein der FDH_H wird deshalb nur unter anaeroben Bedingungen gebildet. Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob auch die Selenierung des Proteins nur unter anaeroben Verhältnissen erfolgt. Um darauf eine Antwort zu finden, wurde in ^{75}Se -Markierungsexperimenten das fdhF Gen durch Vorschalten des starken lac Promotors unter aeroben Bedingungen exprimiert.

Als geeignete Expressionsvektoren standen Plasmide der pUC-Serie zur Verfügung. Sie enthalten außer dem lac Promotor auch Teile des lacZ Gens für die 145 N-terminalen Aminosäuren der β -Galactosidase ("α-Fragment") (109). Zwischen das vierte und fünfte Codon von lacZ wurde ein "Polylinker" mit mehreren Restriktionsstellen eingefügt, der sich im selben Leseraster wie lacZ befindet und deshalb die α-Komplementation nicht stört (109). Zur Konstruktion von pFM28 (Abb. 20) wurde ein 2.3 kb NsiI-BamHI Fragment mit dem fdhF Gen aus dem Plasmid pFM30 (Abb. 7) isoliert und in den Vektor pUC9 (gespalten mit PstI und BamHI) kloniert. Wie in Abbildung 20 ersichtlich, läuft die Translation aus lacZ über die Fusionsstelle hinweg bis zu einem Stoppcodon (UGA) 18 bp vor dem Startcodon von fdhF.

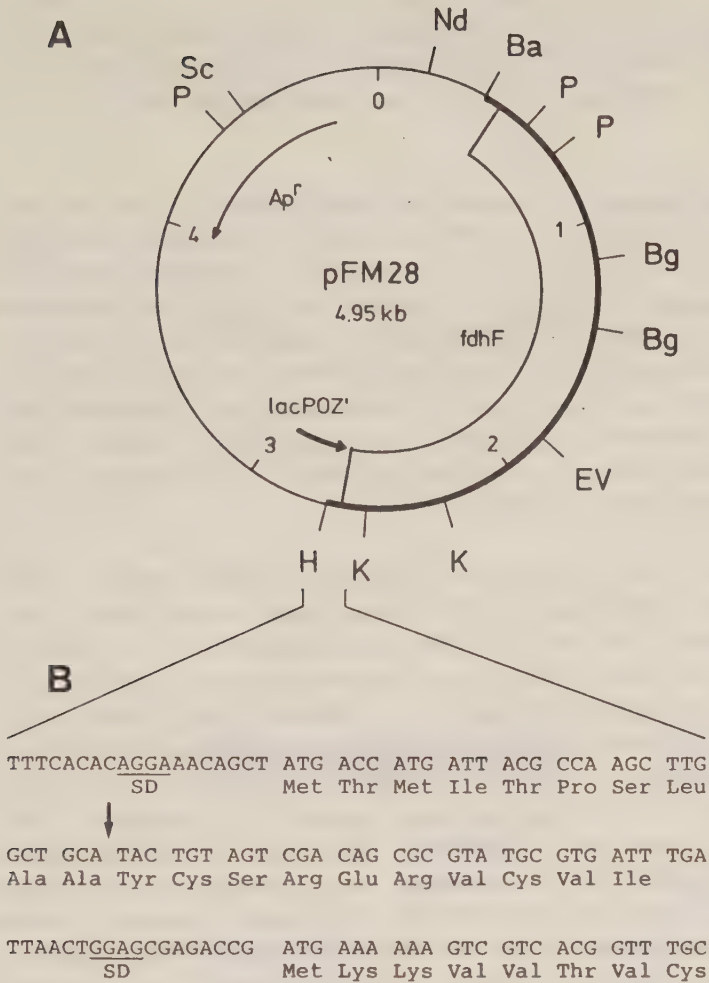


Abbildung 20:

- (A) Restriktionskarte des Plasmids pFM28. Dünne Linie: Anteil des Vektors pUC9; starke Linie: Insertfragment aus pFM30.
- (B) Nucleotidsequenz der Fusionsstelle der *lacZ'*-*fdhF*⁺ Operonfusion. Der senkrechte Pfeil oberhalb der Nucleotidsequenz zeigt die Übergangsstelle (PstI/NsiI).

Dieser Hybridleserahmen kodiert für ein artifizielles Polypeptid aus 20 Aminosäuren. Einige Nucleotide weiter beginnt die Translation erneut am Initiationscodon von fdhF. pFM28 enthält also eine Operonfusion von lacZ' und fdhF.

Als geeigneter Wirtstamm für pFM28 wurde FM1226 konstruiert. Dazu wurde aus BMH71-18 das F'-Episom mit dem lacI^q Gen in den Stamm FM1216 transferiert. FM1216 besitzt kein chromosomales fdhF Gen; dadurch läßt sich die Expression des plasmidkodierten fdhF Gens unter Kontrolle des lac Promotors gezielt untersuchen. Trotz des lacI^q Allels in FM1226 konnte jedoch auch in Abwesenheit des Induktors IPTG eine partielle Expression der lacZ'-fdhF⁺ Fusion festgestellt werden, die sich in einer Komplementation der Δ fdhF Mutation äußerte.

Kulturen von FM1226 mit pUC9 oder pFM28 wurden unter aeroben Bedingungen in LB-Medium ohne Glucose (69, 159) angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Als Wildtypkontrolle diente FM1200. Das Autoradiogramm in Abbildung 21 zeigt das Versuchsergebnis. In FM1200 (fdhF⁺) kam es nur unter anaeroben Anzuchtbedingungen zur Synthese des 80 kDa Selenoproteins, im Extrakt der aerob gewachsenen Zellen konnte es nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erwies sich die Expression von fdhF in FM1226/pFM28 (lacZ'-fdhF⁺) als unabhängig von Sauerstoff und konnte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG im Medium nochmals leicht gesteigert werden. In Zellen von FM1226/pUC9 ließ sich erwartungsgemäß kein Selenoprotein nachweisen.

Die Synthese der Komponenten des "selenierenden Systems" wird also nicht durch Sauerstoff reguliert, möglicherweise ist sie sogar konstitutiv. Die Synthese des 80 kDa Selenoproteins läßt sich in Wildtypzellen nur deswegen

ausschließlich unter anaeroben Wachstumsbedingungen feststellen, weil Sauerstoff die Expression des Strukturgens fdhF verhindert.

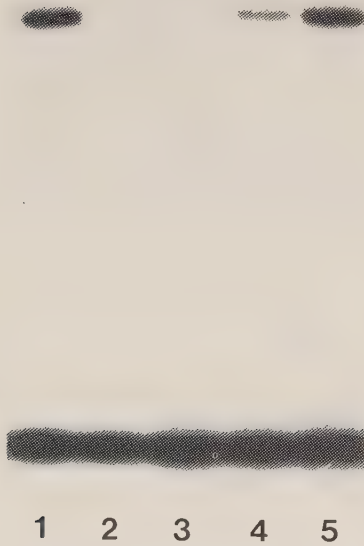


Abbildung 21:

Autoradiogramm ⁷⁵Se-Selenit markierter Extrakte nach aerober bzw. anaerober Anzucht.

Spur 1: FM1200 (anaerob)

Spur 2: FM1200 (aerob)

Spur 3: FM1226/pUC9 (aerob)

Spur 4: FM1226/pFM28 (aerob ohne IPTG)

Spur 5: FM1226/pFM28 (aerob mit 0.1 mM IPTG)

8. Konstruktion von fdhF-lacZ Genfusionen und Analyse der Fusionsproteine

Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse und der Versuche zur Synthese verkürzter Selenopolypeptide lieferten bereits starke Hinweise auf ein Überlesen des internen UGA Codons in fdhF. Der endgültige Beweis konnte schließlich mit Hilfe von fdhF-lacZ Genfusionen geführt werden. In solchen Genfusionen kann es nur dann zur Bildung von Fusionsproteinen kommen, wenn sich beide Gene als Teile der Fusion im selben Leseraster befinden und somit das gesamte Hybridgen translatiert wird. Im Fall von fdhF-lacZ ist die Expression von β -Galactosidasehybriden aber strikt an das Überlesen des internen UGA Codons in fdhF gekoppelt und kann deshalb zur quantitativen Bestimmung der Durchleserate benutzt werden.

a) Plasmidkonstruktionen

Es wurden drei verschiedene fdhF-lacZ Genfusionen verwendet. Die Hybridgene in pFM52 und pFM54 enthielten das UGA Codon im fdhF Segment, in pBN2 hingegen war das lacZ Gen weiter stromauf an fdhF fusioniert. In allen drei Plasmiden standen die fdhF-lacZ Fusionen unter der Kontrolle des fdhF Promotors, daher war nur unter anaeroben Wachstumsbedingungen β -Galactosidase-Aktivität nachweisbar (nicht gezeigt).

Das Plasmid pBN2 kodiert für ein Fusionsprotein mit 115 kDa, der FDH_H -Anteil umfaßt dabei 39 N-terminale Aminosäuren. Für die Konstruktion (A. Birkmann, pers. Mitteilung) wurde ein 863 bp *SmaI*-*KpnI* Fragment aus pFM3 (vgl. Abb. 4) isoliert und in den Vektor pMC1403 kloniert.

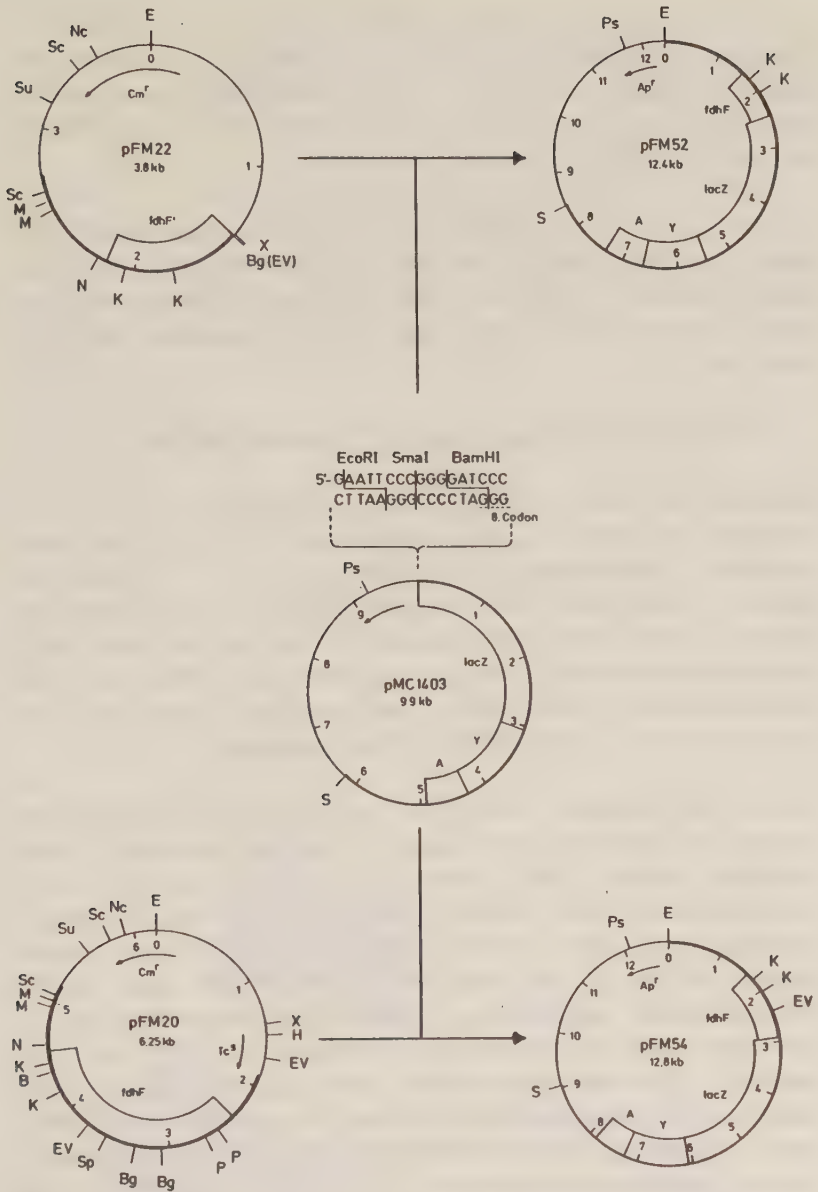


Abbildung 22: Konstruktion der Plasmide pFM52 und pFM54.

Zur Konstruktion von pFM52 wurde ein 2.5 kb EcoRI-BglII Fragment aus pFM22 isoliert und in pMC1403 (gespalten mit EcoRI und BamHI) kloniert. Das durch pFM52 exprimierte Fusionsprotein mit 140 kDa enthielt 268 N-terminale Aminosäuren von FDH_H (Abb. 22).

Zur Konstruktion von pFM54 wurde ein 3.0 kb EcoRI-BamHI aus pFM20 isoliert und in pMC1403 (gespalten mit EcoRI und BamHI) kloniert. Das durch pFM54 exprimierte Fusionsprotein mit 156 kDa enthielt 420 N-terminale Aminosäuren von FDH_H (Abb. 22).

b) Analyse des Selineinbaus in Fusionsproteine

Kulturen von FM420 (Δ lac fdhF⁺ recA) (vgl. Abb. 3B) mit den Plasmiden pMC1403, pBN2, pFM52 und pFM54 wurden unter anaeroben Bedingungen angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Das Autoradiogramm in Abbildung 23 zeigt das Ergebnis. Neben dem (chromosomal kodierten) 80 kDa FDH_H-Selenoprotein wurden auch die von pFM52 und pFM54 kodierten Fusionsproteine seleniert. Im Gegensatz dazu war das Fusionsprotein von FM420/pBN2 nicht seleniert.

Anscheinend kompetitierten die selenierten Fusionsproteine und das 80 kDa FDH_H-Selenoprotein um die begrenzte Selenierungskapazität der Zellen. In den Extrakten von FM420/pFM52(54) war nämlich die Bande des 80 kDa FDH_H-Selenoproteins auf dem Autoradiogramm deutlich schwächer ausgeprägt als in Extrakten von FM420/pMC1403 bzw. pBN2. Das Auftreten selenierter β -Galactosidasehybride korrelierte mit der Anwesenheit des UGA Codons im fdhF Teil der Genfusion. Das und die Tatsache, daß auch Proteine mit ganz anderer räumlicher Struktur als das Selenoprotein der FDH_H, nämlich Fusionsproteine, effizient seleniert werden können, liefern einen starken Hinweis auf einen co-translationalen Einbaumodus für Selen.

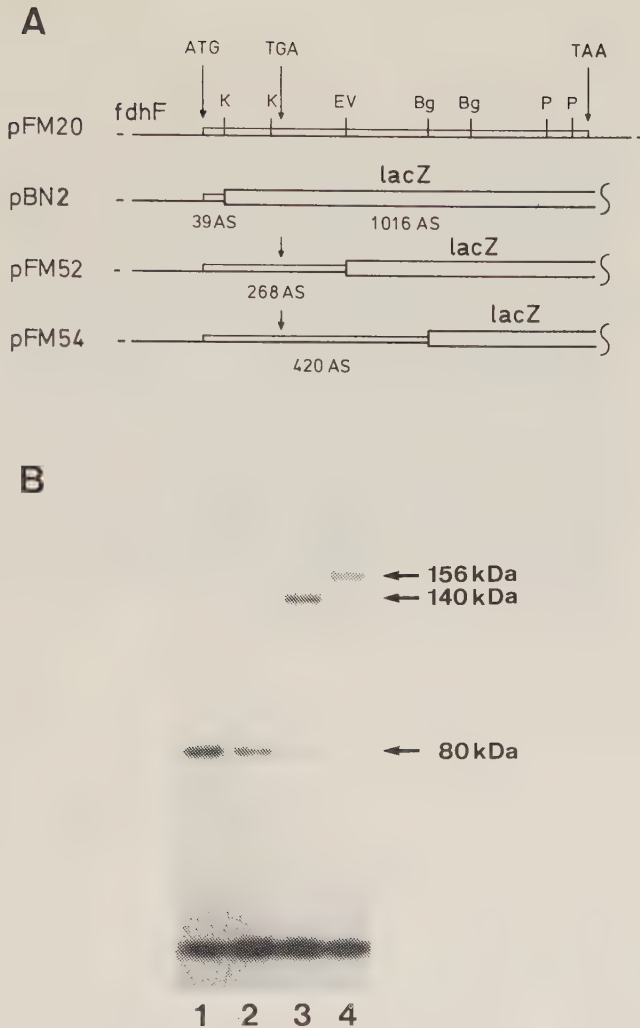


Abbildung 23:

(A) Vereinfachte Restriktionskarten der *fdhF-lacZ*

Fusionsplasmide.

(B) Autoradiogramme ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte von FM420 mit verschiedenen Plasmiden.

Spur 1: pMC1403

Spur 2: pBN2

Spur 3: pFM52

Spur 4: pFM54

c) Immunologische Analyse

Ergänzende immunologische Untersuchungen der verschiedenen β -Galactosidase-Hybride wurden mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt, die gegen β -Galactosidase gerichtet waren. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. G. Schumacher (Tutzing) zur Verfügung gestellt.

Se-markierte und unmarkierte SDS-Extrakte anaerob gewachsener Zellen von FM420 mit den Plasmiden pMC1403, pBN2, pFM52 und pFM54 wurden nebeneinander auf einem Gel aufgetrennt. Als Kontrollstamm diente Hfr3300 (lacZ⁺ lacI), der β -Galactosidase konstitutiv exprimiert. Die Proteine der unmarkierten Extrakte wurden elektrophoretisch auf NC-Filter übertragen ("Western blot") und mit Anti- β -Galactosidase-Antikörpern inkubiert. Die Autoradiogramme des NC-Filters (nach Behandlung mit ¹²⁵J-markiertem Protein A) und der Gelhälfte mit den ⁷⁵Se-markierten Zellextrakten sind nebeneinander in Abbildung 24 zu sehen.

Durch die Antikörper, die mit dem β -Galactosidaseanteil der verschiedenen Fusionsproteine reagierten, konnte auch das nicht selenierte β -Galactosidasehybrid aus FM420/pBN2 detektiert werden. Die selenierten Proteine in FM420/pFM52 bzw. pFM54 mit sehr hohem Molekulargewicht wurden ebenfalls von den Antikörpern erkannt. Die Negativkontrolle zeigte keine Reaktion mit dem Serum.

Unerwarteterweise reagierten die Antikörper auch mit einem Protein von etwa 120 kDa. Nachdem das Signal nur in Extrakten auftrat, die Fusionsproteine enthielten, könnte es sich bei der 120 kDa Spezies um ein Abbauprodukt handeln. Das Auftreten von Proteolyseprodukten konstanter Größe bei ursprünglich verschieden großen Fusionsproteinen deutet auf sterische Effekte beim proteolytischen Abbau hin. Es ist bekannt, daß β -Galactosidase(hybride) zu aktiven Enzymkomplexen tetramerisieren, wobei die Aminosäuren der N-terminalen Bereiche aus dem Komplex herausragen (89).

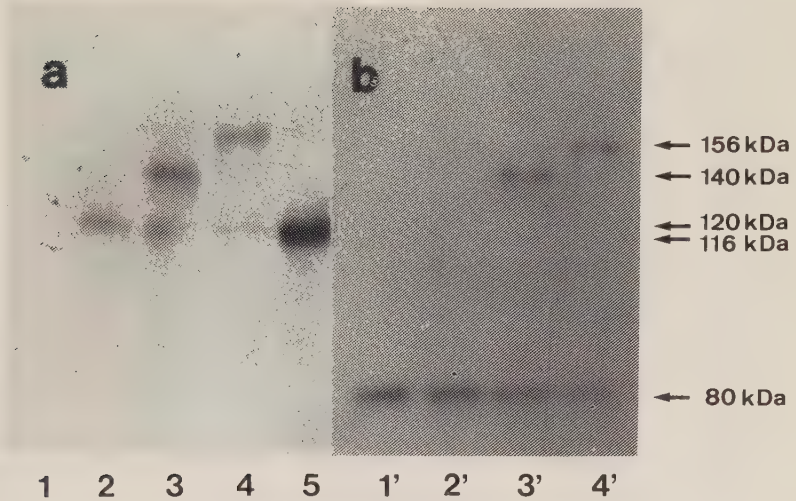


Abbildung 24:

Immunologischer Nachweis von Fusionsproteinen.

- (A) Autoradiogramm eines Immunoblots unmarkierter Extrakte von FM420 mit verschiedenen Plasmiden nach Behandlung mit β -Galactosidase-Antikörpern und ^{125}J -markiertem Protein A.
- (B) Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte entsprechend zu (A).

Spur 1, 1': pMC1403

Spur 2, 2': pBN2

Spur 3, 3': pFM52

Spur 4, 4': pFM54

Spur 5 : Hfr3300

Durch immunologische Methoden konnte weiterhin gezeigt werden, daß in fdhF-lacZ Fusionen die Translation bei Selenmangel am UGA Codon in fdhF terminiert und in der Folge keine β -Galactosidase entsteht. Wie A. Birkmann gefunden hatte, ist die Synthese von β -Galactosidasehybriden in FM420/pFM52(54) an die ausreichende Supplementierung der Kulturen mit Na-Selenit gebunden. Bei Selenmangel sinkt die β -Galactosidase-Aktivität auf etwa 10 % des Kontrollwerts. Die β -Galactosidase-Aktivität in FM420/pBN2 hingegen war - unabhängig von der Supplementierung mit Selenit - immer gleich hoch, ein Einfluß von Selen auf die Transkription war deshalb auszuschließen. Es besteht deswegen ein Zusammenhang zwischen der Supplementierung mit Selenit und dem Überlesen des internen UGA Codons in fdhF.

Von A. Birkmann wurden Zellen von FM420/pFM54 zur Verfügung gestellt, die anaerob in Minimalmedium mit und ohne Selenitsupplement gewachsen waren. Die SDS-Zellextrakte wurden nach Gelelektrophorese auf NC-Filter transferiert und mit β -Galactosidase-Antikörpern inkubiert. Das Autoradiogramm des Filters ist in Abbildung 25 zu sehen. Die Antikörper können β -Galactosidasehybride nur in Zellen detektieren, die in Anwesenheit von Na-Selenit gewachsen waren (Banden bei 156 kDa und 120 kDa). In Zellen ohne ausreichendes Selenitsupplement werden keine β -Galactosidasehybridproteine gebildet.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

1. Das interne UGA Codon in fdhF wird überlesen und steht in Zusammenhang mit der Selenierung des Genprodukts.
2. Der Durchleseprozeß ist an die ausreichende Versorgung der Zellen mit Selen gebunden. In Mangelsituationen kommt es zum Abbruch der Translation in fdhF.

3. Der Selenierungsvorgang läuft wahrscheinlich co-translational ab und orientiert sich nicht an der räumlichen Struktur eines noch selenfreien Apoproteins.

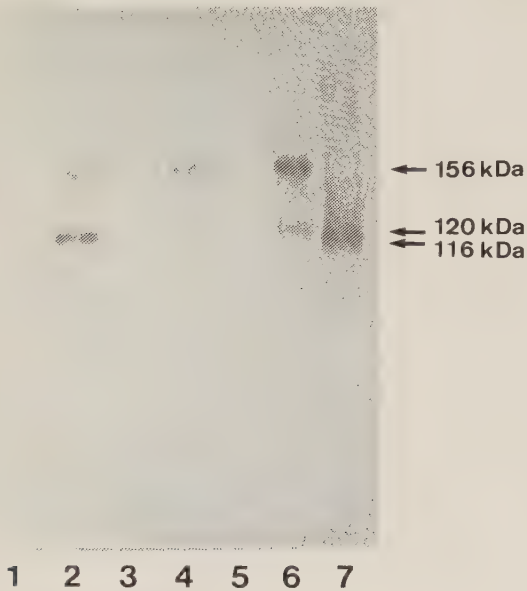


Abbildung 25:

Immunoblot-Experiment zur Bildung von *fdhF-lacZ* Fusionsproteinen in FM420/pFM54 in Abhängigkeit von Selen.

- Spur 2, 3: stationäre Kultur mit 10 µM bzw. ohne Selenit;
Spur 4, 5: exponentielle Kultur mit 10 µM bzw. ohne Selenit;
Spur 6: exponentielle Kultur nach Anzucht in LB-Vollmedium (vgl. Abb. 24 B);
Spur 1: FM420/pMC1403, siehe Spur 6;
Spur 7: Hfr3300, siehe Spur 6.

9. Untersuchungen zum Einfluß pleiotroper fdh, chl und trpT Mutationen auf die Expression von fdhF

a) Mutationen in fdhA und fdhB

Defekte in den Genen fdhA, fdhB und fdhC führen zum Ausfall der Aktivität beider Formiatdehydrogenasen in *E. coli* (72). Dadurch unterscheiden sie sich von den fdhF Mutanten, in denen spezifisch die FDH_H -Aktivität ausfällt. Beide Formiatdehydrogenasen enthalten ein Selenoprotein als Unter-einheit, insofern wäre eine Beteiligung der Gene fdhA-C am Selenstoffwechsel von *E. coli* denkbar.

Die isogenen Stämme FD03 (fdhA), FD07 (fdhB) und BW113 (fdh⁺) wurden deshalb unter anaeroben Bedingungen angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. In Abbildung 26 ist das Autoradiogramm dieses Versuchs abgebildet. Die markierte Bande des 80 kDa Selenoproteins ist nur im Extrakt von BW113 sichtbar, nicht hingegen in den Extrakten der beiden Mutanten FD03 und FD07. Außerdem fehlte in FD07 auch der Einbau von Selen in tRNA, zu erkennen an der nur äußerst schwachen Schwärzung des Films an der Lauffront des Gels. Das 110 kDa Selenoprotein wird in diesen beiden Mutanten ebenfalls nicht gebildet (W. Leinfelder, unveröffentlicht). Die Genprodukte von fdhA und fdhB sind also wahrscheinlich Komponenten des Selenstoffwechsels in *E. coli*. fdhB scheint an der Aufnahme oder an der Reduktion von Selenit beteiligt zu sein, während fdhA für den Seleneinbau in Proteine von Bedeutung ist.

Von W. Leinfelder wurden Mutanten von MC4100 mit Defekten in fdhA isoliert, die sich in ⁷⁵Se-Markierungsversuchen und in Enzymtests identisch zur Mutante FD03 verhielten (W. Leinfelder, pers. Mitteilung). Zwei dieser Stämme, WL30153 (Δ fdhA) und sein recA-Derivat WL31153 wurden von ihm zur Verfügung gestellt. Die fdhF-lacZ Plasmide pBN2, pFM52 und pFM54 wurden in WL31153 transformiert. Es zeigte sich, daß

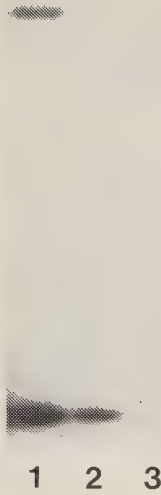


Abbildung 26:

Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte.

Spur 1: BW113 (fdh⁺)

Spur 2: FD03 (fdhA)

Spur 3: FD07 (fdhB)

anaerob gewachsene Transformanten mit pBN2 Lac⁺ waren, Transformanten mit pFM52 und pFM54 dagegen Lac⁻. Dieser Lac-Phänotyp trat auch in anaerob gewachsenen Wildtypzellen mit fdhF-lacZ Fusionen auf, wenn ihnen nicht genügend Selen im Medium zur Verfügung stand. In Zellextrakten von WL31153/pFM54 konnte nach Zugabe von ⁷⁵Se-Selenit weder ein markiertes 80 kDa FDH_H-Protein noch ein markiertes 156 kDa Fusionsprotein festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz von WL31153 bot deshalb in späteren Experimenten große Vorteile, da er die Herstellung und Verwendung eines selenfreien Mediums mit den damit verbundenen Schwierigkeiten überflüssig machte.

b) Mutationen in chlA und chlB

In chloratresistenten Mutanten von E. coli führen Störungen im Molybdänstoffwechsel (112) zum Ausfall einer ganzen Reihe von Molybdo-Enzymen, darunter Nitratreduktase und beide Formiatdehydrogenasen (10, 65). Nachdem sowohl Molybdän als auch Selen für die Bildung aktiver Formiatdehydrogenasen essentiell sind (100), lag es nahe, den Einfluß verschiedener chl Mutationen auf die Expression von fdhF-lacZ zu untersuchen und ihn mit dem von fdhA und fdhB zu vergleichen.

Die drei lac Fusionsplasmide pBN2, pFM52 und pFM54 wurden in die isogenen Stämme RK4353 (chl⁺), RK5200 (chlA) und RK5208 (chlB) transformiert. In anaerob gewachsenen Kulturen wurde dann die β -Galactosidase-Aktivität gemessen (Tab. 11). Die Expression der lac Fusionen variierte leicht von Stamm zu Stamm. So waren die Aktivitätswerte in der chlA Mutante generell etwas höher und in der chlB Mutante allgemein etwas niedriger als im Wildtyp. Die Länge des fdhF-Anteils in den verschiedenen fdhF-lacZ Fusionen spielte jedoch keine Rolle für die Höhe der β -Galactosi-

dase-Aktivität. Es kann also ausgeschlossen werden, daß die Expression von fdhF von der Anwesenheit eines funktionellen Molybdäncofaktors abhängt.

Tabelle 11: Expression von fdhF-lacZ Fusionen in chloratresistenten Mutanten

Stamm ^a	β-Galactosidase ^b		
	pBN2	pFM52	pFM54
RK4353 (<u>chl</u> ⁺)	850	950	1000
RK5200 (<u>chlA</u> ::Mu cts)	1350	1370	1430
RK5208 (<u>chlB</u> ::Mu cts)	580	697	990

a) Anzucht anaerob bei 30°C in TGYEP-Medium mit Ampicillin

b) Einheiten spezifischer Aktivität nach Miller (1972)

c) Mutation in trpT

Suppressormutanten von *E. coli*, die eine veränderte tRNA^{Trp} besitzen (77), können UGA ("opal") Codons bei der Translation überlesen und inserieren an den entsprechenden Stellen Tryptophan in Proteine. Die bisherigen Ergebnisse brachten das Auftreten eines UGA Codons in fdhF in engen Zusammenhang mit der Inkorporation von Selen in das 80 kDa FDH_H-Protein. Es war deshalb interessant zu wissen, ob das Überlesen des fdhF-internen UGA Codons und der Selenierungsprozeß in Anwesenheit einer Suppressor-tRNA voneinander entkoppelt werden können.

Dem Suppressorstamm CDJ64 fehlt die Fähigkeit zur Gasbildung. Um zu untersuchen, ob die sup-9 Mutation den Ausfall der FDH_H verursachte, wurde sup-9 in MC4100 transferiert. Zuerst wurde das Markerpaar metE163::Tn10 ilvC7 aus RK4349 in MC4100 transduziert. Einer der Met^- Ilv^- Klone (FM440) wurde dann mit einem Pl-Lysat auf CDJ64 (ilv⁺ sup-9) zu ilv⁺ transduziert. Von zehn getesteten Ilv^+ Klonen besaßen neun das sup-9 Allel, nur ein Klon war suppressorfrei (sup^o). Davon unabhängig konnten jedoch alle zehn Transduktanten Gas bilden, quantitative Unterschiede wurden nicht festgestellt. Der Ausfall der FDH_H -Aktivität in CDJ64 wurde also nicht durch sup-9, sondern durch eine zusätzliche Mutation bewirkt. CDJ64 wurde diesbezüglich nicht näher untersucht.

Tabelle 12: Mögliche Suppression des internen UGA Codons in fdhF durch sup-9

Stamm ^a	β-Galactosidase ^b		
	pBN2	pFM52	pFM54
FM445 (Δ <u>fdhA</u> <u>sup</u> ^o)	4066	14	22
FM446 (Δ <u>fdhA</u> <u>sup-9</u>)	3880	40	55

a) Anzucht anaerob bei 37°C in TGYEP-Medium mit Ampicillin und 30 mM Na-Formiat

b) Einheiten spezifischer Aktivität nach Miller (1972)

In fdhA Mutanten wurde in Anwesenheit von pFM54 (fdhF-lacZ) kein β -Galactosidase-Fusionsprotein gebildet, weil die Translation im fdhF-Genanteil der Fusion terminierte. Dieses Modellsystem war deshalb dafür geeignet, die Supprimierbarkeit des UGA Codons in fdhF durch sup-9 zu quantifizieren. Die Höhe der β -Galactosidase-Expression ist dabei das Maß für die Überlebensrate durch den Suppressor. Auf FM443 (sup-9 metE163::Tn10) wurde ein P1 Lysat präpariert und zur Transduktion von WL30153 (fdhA) verwendet. Unter den Tc-resistenten Transduktanten wurden zwei Klone ausgewählt: FM445 (Δ fdhA sup^o) und FM446 (Δ fdhA sup-9). Anschließend wurden die fdhF-lacZ Plasmide pBN2, pFM52 und pFM54 in FM445 und FM446 transformiert. In anaerob gewachsenen Kulturen dieser Stämme wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Die Expression der lac Fusionen wurde durch externes Formiat (30 mM) maximal induziert, um auch niedrige Suppression feststellen zu können. Die Ergebnisse des Enzymtests sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Von Suppression am internen UGA Codon in fdhF findet praktisch nicht statt; die Rate liegt unter 1.5 %. Das erklärt auch, warum kein Einfluß von sup-9 auf die Höhe der FDH_H -Aktivität in MC4100 festzustellen war.

10. Untersuchungen zur Spezifität des Seleneinbaus

a) Seleneinbau in der Mutante HY15

Stamm HY15, der von Dr. Mandrand-Berthelot erhalten wurde, besitzt wie die Stämme M9s und FM909 eine Mutation in fdhF und ist deshalb spezifisch FDH_H -negativ (186). Der Defekt in fdhF wurde erwartungsgemäß durch die Plasmide pFM3 und pFM20 komplementiert.

Kulturen von HY15/pACYC184 und HY15/pFM20 wurden anaerob angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 27 A zu sehen. Unabhängig von der Gegenwart eines funktionellen fdhF Gens kam es in HY15 überraschend zum Einbau von Selen in sämtliche Zellproteine. Das Schwärzungsmuster des Autoradiogramms entsprach genau dem Bandenmuster der mit Coomassie gefärbten Proteine im SDS-Polyacrylamidgel. Vor diesem Hintergrund läßt sich auf dem Autoradiogramm die Bande des 80 kDa Selenoproteins im Extrakt von HY15/pFM20 gerade noch ausmachen.

b) Transduktionsanalyse der Mutante HY15

Im weiteren wurde versucht, mit genetischen Mitteln die Mutation, die den unspezifischen Seleneinbau in HY15 verursacht, von der fdhF Mutation zu trennen. Zum einen wurde das fdhF15 Allel von HY15 in RW262 transduziert. Unter den Mel^+ Transduktanten wurde ein Stammpaar für weitere Untersuchungen ausgewählt: FM2620 (fdh⁺) und FM2625 (fdhF15). Zum anderen wurde das fdhF15 Allel aus HY15 ausgekreuzt. HY15 wurde dazu mit einem Pl Lysat von FM72 (fdh⁺ mel::Tn10) infiziert. Zwei der Tc-resistenten Transduktanten wurden in die Versuche eingesetzt: FM150 (fdh⁺) und FM151 (fdhF15). Die beiden Stammpaare und der Ausgangsklon HY15 wurden anaerob angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 27 B zu sehen.

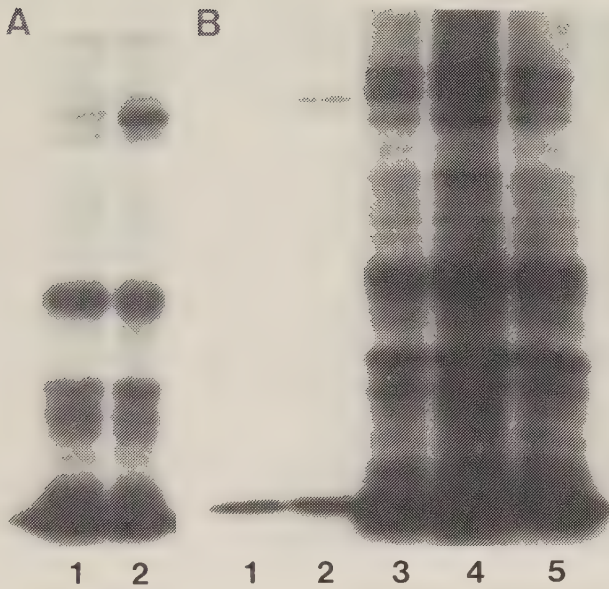


Abbildung 27:

Unspezifischer Einbau von Selen in Zellproteine in der Mutante HY15.

Autoradiogramme ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte.

(A) Spur 1: HY15/pACYC184
Spur 2: HY15/pFM20

(B) Spur 1: FM2620
Spur 2: FM2625
Spur 3: HY15
Spur 4: FM150
Spur 5: FM151

In den Stämmen des FM2620 und FM2625 wurde das FDH_H -Selenoprotein gebildet und spezifisch mit ^{75}Se markiert. Aus der Tatsache, daß das inaktive und das aktive Selenoprotein dasselbe Molekulargewicht aufwiesen, ist auf eine missense-Mutation in fdhF zu schließen, die zum Einbau einer falschen Aminosäure führt. Das inaktive Genprodukt wurde aber, ganz im Gegensatz zu den verkürzten Selenopolypeptiden, nicht schneller als das Wildtypprotein abgebaut. In HY15 konnte, genauso wie im Stammpaar FM150/151, unspezifischer Seleneinbau festgestellt werden. Welcher Art die zusätzliche Mutation ist, kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Aus dem genetischen Ansatz geht aber hervor, daß sie sich außerhalb des Genom-Segments fdhF-mel befindet.

11. Lokalisierte Mutagenese im fdhF Gen mit Hilfe von Oligonucleotiden

Als Summe der bisherigen Ergebnisse zu Struktur und Expression des fdhF Gens trat immer deutlicher der Zusammenhang zwischen der Existenz eines UGA Codons in fdhF und der Selenierung des Genprodukts zu Tage. Durch gezielte Mutagenese dieses UGA Codons sollte nun nachgewiesen werden, daß dieses Stoppcodon den Einbau der Aminosäure Selenocystein am Ribosom determiniert.

a) Austausch des Codons UGA gegen UGC

Es erschien sinnvoll, das Codon UGA zunächst in UGC umzuwandeln, im genetischen Code steht UGC für Cystein. Das Vorgehen orientierte sich an der "gapped duplex" Methode, die von Fritz und Mitarbeitern (90, 91) entwickelt wurde (siehe (90) für die ausführliche Diskussion der Methode). Zunächst wurde ein 590 bp KpnI-SphI Fragment (Position 1133-1723 in Abb. 9) aus pFM20 in pUC19 kloniert (→pFM100) und anschließend über die flankierenden HindIII und EcoRI-Stellen des Polylinkers in M13mp9 umgesetzt (Abb. 28). Aus einem der Phagenklone, M13FM100 wurde ssDNA isoliert und mit linearisierter RF-DNA von M13mp19 gemischt, um "gapped duplex" DNA zu erhalten. Als mutagenes Oligonucleotid wurde ein 48mer eingesetzt, das von Dr. R. Mertz (Genzentrum) synthetisiert wurde. Das Oligonucleotid wurde vor der Mutagenese phosphoryliert und über ein denaturierendes 10 % Polyacrylamidgel gereinigt. Die Sequenz war 5'-GTACCAATAACGTTGACTGCTGCGCTCGTGTCTG⁺CCACGGCCCATCGG-3'. Die Länge des Oligonucleotids wurde so gewählt, daß sich nach der Anhybridisierung an die "gapped duplex" DNA das 5' Ende unmittelbar neben dem 3' Ende des (-) Stranges von M13mp19 befand und deshalb in vitro mit DNA Ligase kovalent verbunden werden konnte. Dadurch war das 5' Ende des Oligonucleotids vor dem Angriff durch zelleigene Nuklease-

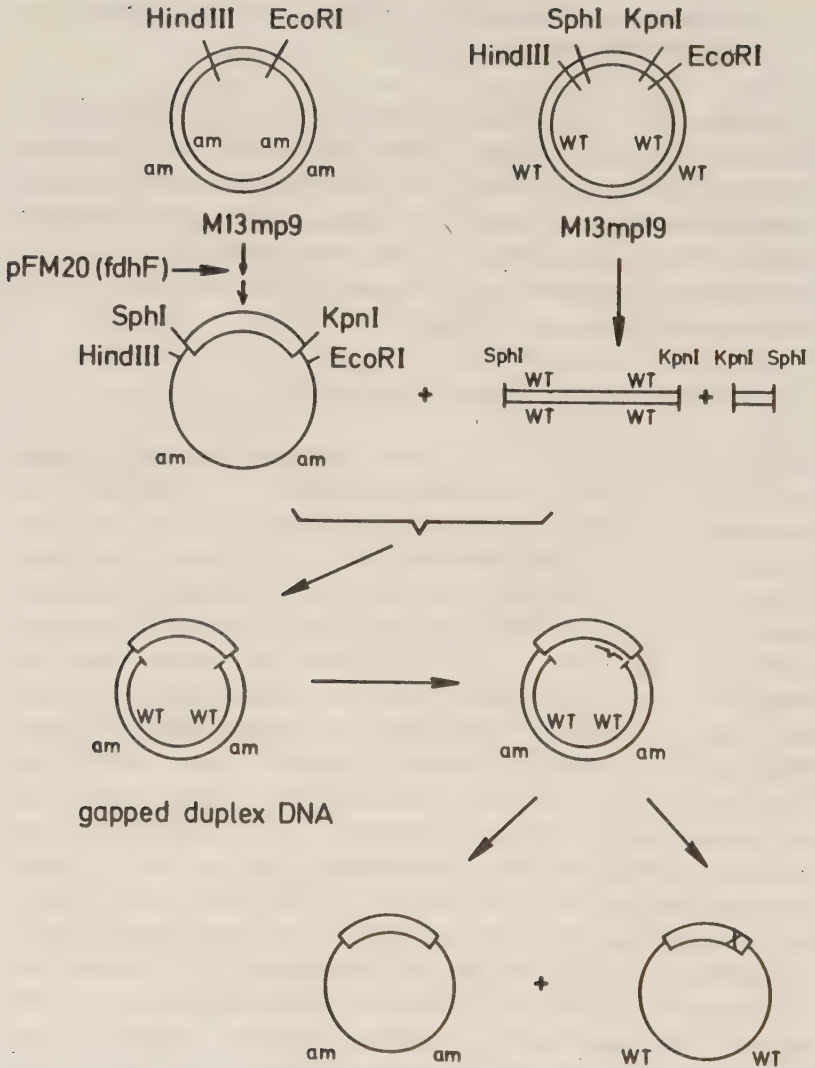


Abbildung 28:

Flußdiagramm der lokalisierten Mutagenese mit Oligonucleotiden nach der "gapped duplex" Methode.

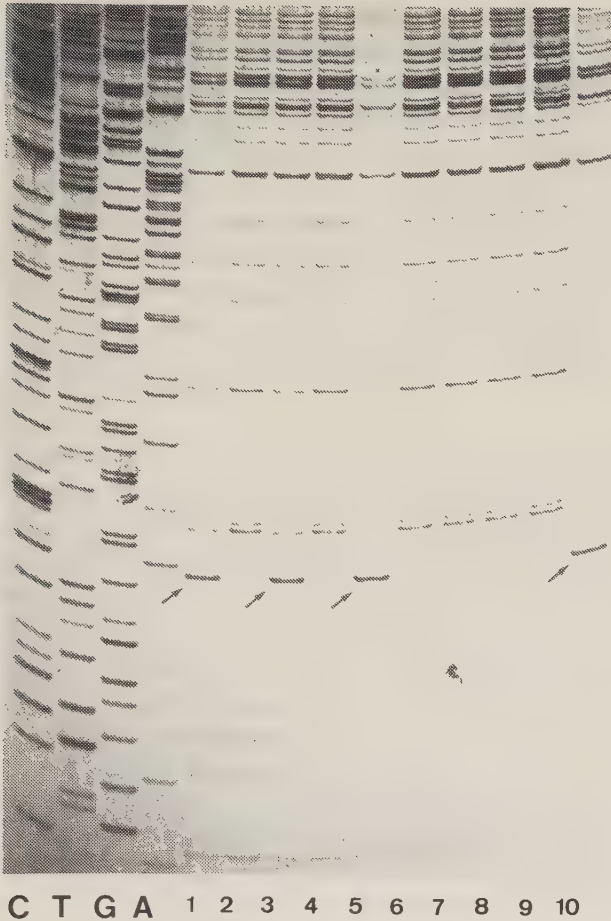


Abbildung 29:

Mutantenscreening mittels DNA-Sequenzierung.

Als Standard dient die Sequenz des Ausgangsklons M13FM100 mit dem 590 bp KpnI-SphI Insert ("GATC").

Spur 1-10: "C"-Sequenzreaktion von zehn willkürlich gepickten M13-Klonen nach Mutagenese. Die Klone 1, 3, 5 und 10 zeigen den Basenaustausch A → C.

aktivitäten geschützt. Die Transfektion erfolgte ohne vorherige Inkubation mit DNA-Polymerase, die Einzelstranglücke wurde also in vivo geschlossen. Die Reinfektion mit niedriger Multiplizität erfolgte in den Stamm MK30-3 (recA sup^o). Zehn Plaques wurden gepickt, ssDNA der M13-Klone wurde isoliert und sequenziert. Vier der getesteten Klone zeigten den gewünschten Basenaustausch von UGA zu UGC (Abb. 29). Von einem M13-Klon (M13FM101) wurde RF-DNA isoliert, und das gesamte 590 bp Insert wurde nach der chemischen Methode von den Flanken aus sequenziert. Dabei wurde gefunden, daß im Insert keine zusätzliche Mutation vorhanden war.

Das Insert wurde schließlich wieder in das Plasmid pFM20 zurückklont ($\longrightarrow$ pFM201). Überraschenderweise konnte pFM201 wie pFM20 die Mutante FM911 (Δ fdhF) komplementieren. Das nachfolgende ⁷⁵Se-Markierungsexperiment brachte zwei überraschende Ergebnisse: Zum einen wurde das 80 kDa Selenoprotein in FM911/pFM201 immer noch seleniert, wenn auch wesentlich schwächer als im Wildtyp FM911/pFM20. Zum anderen zeigte sich anhand des Coomassie-gefärbten Proteinmusters, daß die Expressionsrate des mutierten fdhF Gens deutlich zunahm. Die geschätzte Selenierungsrate des mutierten fdhF Genprodukts lag bei 5 - 10 % des Wildtyps.

Um das UGA Codon in ein Cysteinocodon umzuwandeln, mußte zwangsläufig die dritte Base des Codons, die "wobble" Position (43), verändert werden. Das Phänomen der partiellen Selenierung des fdhF (UGC) Genprodukts deutete im Rahmen eines co-translationalen Seleninbaus auf die Wechselwirkung zwischen dem UGA Codon und einer tRNA. Diese hypothetische Suppressor-tRNA könnte mit Selenocystein oder einem Vorläufer aminoacyliert sein und am internen UGA Codon in fdhF den Einbau von Selenocystein vermitteln. Insofern könnte sich die partielle Selenierung des fdhF (UGC) Genprodukts auf eine Konkurrenz zwischen den kognaten tRNA^{Cys} und einer hypothetischen tRNA^{SeCys} zurück-

führen lassen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in das UGA Codon in einem weiteren Mutageneseexperiment Basenaustausche in der dritten Position (zu UGU) und in der Mittelposition (zu UCA) eingeführt. Im genetischen Code steht UGU für Cystein und UCA für Serin.

b) Austausch des Codons UGA gegen UGU bzw. UCA

Als Alternative zur "gapped duplex" Methode wurde in diesem Experiment mit Abwandlungen nach der Beschreibung von Zoller und Smith (1983) vorgegangen (Dr. T. Dinger mann, K. Nerke, pers. Mitteilung).

Zunächst wurde ein 1.3 kb NsiI-BglII Fragment (Position 693 - 2008 in Abb. 9) aus pFM20 in M13mp9 (gespalten mit PstI und BamHI) umklontiert. Aus einem der rekombinanten Klone (M13FM99) wurde ssDNA isoliert. Als mutagene Oligonucleotide wurden zwei 19mere verwendet, die freundlicherweise von Dr. P. Buckel (Tutzing) zur Verfügung gestellt wurden. Die Oligonucleotide wurden vor der Mutagenese phosphoryliert und auf denaturierenden 20 % Polyacrylamidgelen gereinigt. Die Sequenz des Oligonucleotids "UGU" war 5'-GGCCGTG^{*}ACAGACACGAGC-3', die Sequenz von "UCA" war 5'-GGCCGTG^{*}TAGACACGAGC-3'. Die Oligonucleotide wurden in zwei Ansätzen an ssDNA von M13FM99 anhybridisiert und dienten als Primer für die in vitro Synthese des zweiten DNA-Stranges. Nach Transfektion in FM1226 (F', Δ fdhF) wurden die Phagenplaques auf NC-Filter transferiert und mit den ³²P-markierten Oligonucleotiden "UGU" und "UCA" als Probe hybridisiert. Die Oligonucleotide paarten zwar perfekt mit ssDNA der Mutanten, wiesen aber bei der Hybridisierung mit der ssDNA des Wildtyps Fehlpaarungen auf. Die unterschiedliche Schmelztemperatur der Hybride konnte deshalb zur Unterscheidung herangezogen werden. Nach der "Wallace-Regel" (167) ergab sich in beiden Fällen für die perfekt gepaarten Hybride eine T_m (Schmelztemperatur) von 64°C und für Hybride mit Fehlpaarungen eine T_m von 56°C. Bei der

Berechnung wurde davon ausgegangen, daß auch die Bindungen zu beiden Seiten der fehlgepaarten Stelle zu vernachlässigen seien. Als Hybridisierungstemperatur wurde deshalb 50°C gewählt. Nach den ersten Waschungen bei Raumtemperatur und bei 45°C wurden die Filter exponiert. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde anhand der Autoradiogramme sichtbar, daß der Primer "UCA" deutlich schwächer hybridisierte als der Primer "UGU". Von den etwa 1000 Plaques pro Platte gaben jeweils 10 - 20 ein deutlich stärkeres Signal, das auch durch Waschen bei 51°C, 58°C und 64°C nicht verloren ging. Vermutlich waren also bereits die Hybridisierungsbedingungen relativ stringent gewesen. Es dürfte auch eine Rolle gespielt haben, daß die Oligonucleotide in der Umgebung des UGA Codons selbstkomplementäre Sequenzen aufwiesen, die bei "UCA" um zwei Basen länger waren als bei "UGU". Die damit einhergehende Rückpaarung führte dann zu schwächeren Hybridisierungssignalen.

In beiden Ansätzen wurden je vier positive Plaques gepickt und nach Infektion von FM1226 erneut der differentiellen Hybridisierung unterworfen. Auf diese Weise wurden reine Phagenklone für die Sequenzierung und Rückklonierung erhalten. Eine Überprüfung der DNA-Sequenz nach der enzymatischen Methode war nicht möglich, da sich die mutagenisierte Stelle in der Mitte des 1.3 kb Inserts befand. Es wurde deshalb RF-DNA von je einer Phagenlinie präpariert und ein 769 bp BglI-SphI Fragment (Position 954-1723 in Abb. 9) nach der chemischen Methode sequenziert. Es waren außer der gewünschten Mutation keine anderen Basenaustausche feststellbar. Die BglI-SphI Fragmente wurden schließlich aus M13 wieder in pFM20 zurückkloniert. Das Plasmid mit fdhF (UGU) wurde als pFM202, das Plasmid mit fdhF (UCA) wurde als pFM203 bezeichnet.

c) Analyse des Seleneinbaus in die Genprodukte der mutierten fdhF Gene

Nach dem Austausch des Tripletts UGA gegen Codons für Cystein (UGC bzw. UGU) und ein Codon für Serin (UCA) wurden die veränderten Genprodukte auf enzymatische Aktivität und Selenierbarkeit untersucht.

Zunächst wurde ein qualitativer Aktivitätstest in Form eines Komplementationsversuchs durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide pFM20 (UGA), pFM201 (UGC), pFM202 (UGU) und pFM203 (UCA) in die Stämme FM911 (Δ fdhF) und WL31153 (Δ fdhA) transformiert. Die Transformanten wurden auf Gasbildung getestet. Bis auf pFM203 konnten alle Plasmide die fdhF Mutation in FM911 komplementieren. Damit bestätigte sich das Ergebnis, das mit pFM201 im Rahmen der ersten Mutagenese erzielt worden war. In WL31153 dagegen ließ sich überraschenderweise in Anwesenheit von pFM201 und pFM202 Gasbildung feststellen, nicht aber in Gegenwart von pFM20 und pFM203.

Das Ergebnis des anschließenden Markierungsexperiments mit ^{75}Se -Selenit ist in Abbildung 30 zu sehen. In FM911 wurden das native und die mutierten fdhF Genprodukte in unterschiedlichem Ausmaß seleniert. Die Konversion von UGA zu UCA bedingte den völligen Ausfall der Seleninkorporation in das FDH_H -Protein. Die Basenaustausche in der "wobble" Position (UGA zu UGC bzw. UGU) hingegen ließen immer noch Seleneinbau zu, wenn auch die Einbaurate im Vergleich zum Wildtyp deutlich abnahm. Ganz im Gegensatz dazu war in WL31153 in keinem einzigen Fall Einbau von Selen in die fdhF Genprodukte feststellbar.

Damit ergibt sich eindeutig, daß das 80 kDa Selenoprotein der FDH_H auch dann noch enzymatisch aktiv sein kann, wenn es Cystein anstelle von Selenocystein⁻enthält. Andererseits führt der Austausch gegen Serin zu einem inaktiven Protein.



Abbildung 30:

Seleneinbau in mutierte fdhF Genprodukte.

Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte von WL31153 (Δ fdhA) (Spur 1 - 4) und FM911 (Δ fdhF) (Spur 5 - 8).

Spur 1, 5: pFM20 (UGA)

Spur 2, 6: pFM201 (UGC)

Spur 3, 7: pFM202 (UGU)

Spur 4, 8: pFM203 (UCA)

Nachdem die Änderung benachbarter Basen im UGA Tripletts ganz unterschiedliche Auswirkungen auf die Selenierungsrate des 80 kDa Proteins hat, ergeben sich verstärkt Hinweise auf eine Wechselwirkung des Codons mit einer hypothetischen Suppressor-tRNA, die co-translational die Inkorporation von Selenocystein in die wachsende Polypeptidkette vermitteln könnte.

d) Untersuchungen zum Einfluß von fdhA auf die Expression von fdhF*-lacZ Fusionen

Mit Hilfe von fdhF-lacZ Fusionen wurde abschließend die Durchleserate am mutierten Codon₁₄₀ in den verschiedenen fdhF Varianten untersucht.

Analog zur Konstruktion von pFM54 (Abb. 22) wurde aus den Plasmiden pFM201 (UGC), pFM202 (UGU) und pFM203 (UCA) jeweils ein 3.0 kb EcoRI-BglII Fragment isoliert und in den lac Vektor pMC1403 kloniert. Die rekombinanten Plasmide erhielten die Bezeichnungen pFM56, pFM57 und pFM58. Diese drei und die Plasmide pBN2 und pFM54 wurden in die Stämme FM420 (fdh⁺) und WL31153 (ΔfdhA) transformiert und auf die Synthese von β-Galactosidase getestet. Die gemessenen Enzymaktivitäten sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Wie erwartet, wurde das nicht selenierte β-Galactosidase-hybrid von pBN2 in beiden Stämmen gleich stark exprimiert. Während aber das Fusionsprotein von pFM54 (UGA) in WL31153 aufgrund des Translationsstops im fdhF Anteil der Fusion nicht gebildet wurde, war die Syntheserate für die veränderten Fusionsproteine in der nicht selenierenden Mutante WL31153 mindestens genauso hoch wie im Wildtyp FM420. In den Genfusionen mit mutiertem fdhF Anteil war also die Translation unabhängig vom selenierenden System geworden.

Tabelle 13: Durchleserate am Codon₁₄₀ in fdhF*-lacZ Fusionen

Plasmid ^a	Codon ^b	β-Galactosidase ^c	
		FM420	WL31153
pBN2	-	863	1020
pFM54	UGA	984	0
pFM56	UGC	1292	1510
pFM57	UGU	1248	1526
pFM58	UCA	1319	1632

a) Anzucht anaerob bei 37°C in TGYEP-Medium mit Ampicillin

b) Codon in Position 140 des fdhF Gens

c) Einheiten spezifischer Aktivität nach Miller (1972)

Die Syntheserate für β-Galactosidase nahm in den mutierten fdhF-lacZ Fusionen um 20 % im Vergleich zum Wildtyp zu. In Zellen mit den fdhF Plasmiden pFM201-203 war anhand des Coomassie-gefärbten Proteinmusters in SDS-Polyacrylamidgelen auf eine noch wesentlich stärkere Erhöhung der Syntheserate geschlossen worden. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich einfach erklären: In pFM20 und seinen Derivaten befindet sich stromauf vor dem fdhF Gen das stark exprimierte Cm-Resistenzgen (vgl. Abb. 10), das fdhF Gen wird vermutlich durch dessen Promotor zusätzlich transkribiert. Darauf ergaben sich auch in Maxizellversuchen Hinweise. Aufgrund einer ganz anderen Plasmidstruktur in pFM54 (vgl. Abb. 22) und seinen Abkömmlingen befindet sich dort kein Plasmidpromotor, der in Richtung lac Fusion transkribiert. Offensichtlich ist der fdhF Promoter nicht

so stark, daß es nach der Umwandlung des UGA Triplets in andere Codons zu einer deutlich erhöhten Syntheserate kommen könnte.

12. Expression und Selenierung von fdhF-lacZ Fusionsproteinen in *Salmonella typhimurium*

S. typhimurium besitzt wie *E. coli* einen Formiat-Hydrogenlyasekomplex (10). Genetische Untersuchungen an FDH_H -Mutanten zeigten, daß die Position des betroffenen Gens auf dem *Salmonella* Chromosom homolog zu der des Gens auf dem *E. coli* Genom ist (11). Es war deshalb interessant zu sehen, ob die Expression des *E. coli* fdhF Gens in *S. typhimurium* zu selenierten Genprodukten führen würde; im allgemeinen ist eine solche heterologe Expression zwischen den beiden Spezies problemlos möglich.

In ersten ^{75}Se -Markierungsexperimenten wurde gefunden, daß *S. typhimurium* TL117 unter Gärungsbedingungen ein Selenoprotein synthetisierte, das mit 84 kDa etwas größer ist als das homologe Protein in *E. coli* (nicht gezeigt). Im folgenden wurden Plasmide mit *E. coli* fdhF-lacZ Fusionen in *S. typhimurium* CC4412recA transformiert. *Salmonella* besitzt kein lac Operon, der Lac Phänotyp in den Transformanten resultierte daher ausschließlich aus der Expression der lac Fusionen.

Kulturen von *E. coli* FM420 und *S. typhimurium* CC4412recA mit den Plasmiden pBN2, pFM52 und pFM54 wurden unter anaeroben Bedingungen angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Das Autoradiogramm in Abb. 31 zeigt das Ergebnis. Neben dem (chromosomal kodierten) 84 kDa Selenoprotein wurden in CC4412recA, wie in *E. coli*, auch die von pFM52 und pFM54 kodierten Fusionsproteine seleniert. Dagegen wurde in das von pBN2 kodierte Fusionsprotein kein Selen eingebaut. Die Größe der selenierten β -Galactosidasehybride war in beiden Wirtsstämmen identisch. *S. typhimurium* erkennt also das UGA Triplet im fdhF Gen von *E. coli* ebenfalls als Signal für den Seleneinbau. Dieses Ergebnis beweist, daß es sich bei dem internen UGA Codon in fdhF nicht um eine Besonderheit von *E. coli* K-12 oder seines Substammes MC4100 handelt,

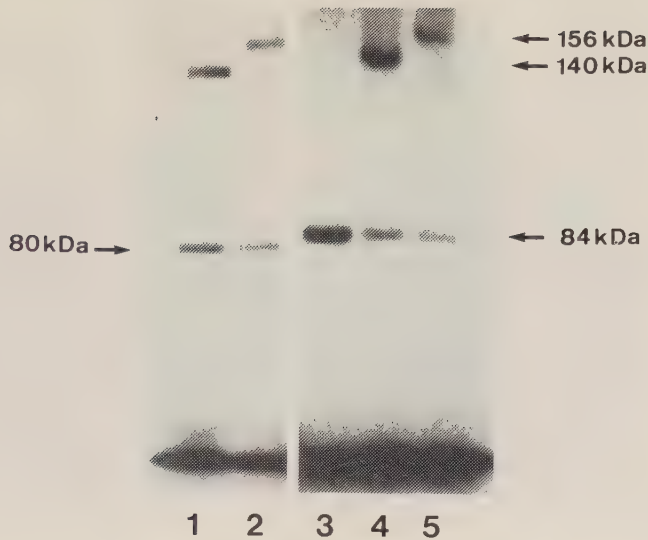


Abbildung 31:

Expression und Selenierung von fdhF-lacZ Fusionsproteinen in *E. coli* (FM420) und *S. typhimurium* (CC4412recA).
Autoradiogramm ^{75}Se -Selenit markierter Extrakte.

- Spur 1: FM420/pFM52
- Spur 2: FM420/pFM54
- Spur 3: CC4412recA/pBN2
- Spur 4: CC4412recA/pFM52
- Spur 5: CC4412recA/pFM54

sondern daß dahinter wahrscheinlich ein Mechanismus von allgemeiner Relevanz stehen könnte, der in Prokaryonten für den Einbau von Selen in Proteine verantwortlich ist.

Ebenso wie in *E. coli* ist auch in *S. typhimurium* die Translation von lacZ in fdhF-lacZ Genfusionen vom Überlesen des internen UGA Codons in fdhF abhängig. Dieser Durchleseprozeß kann nur stattfinden, wenn die Zellen ausreichend mit Selenit supplementiert werden. *S. typhimurium* braucht anscheinend höhere Konzentrationen dieses Elements als *E. coli*. Mit Hilfe von MacConkey Lactose Indikatoragar konnte dieser Unterschied sichtbar gemacht werden (Abb. 32). Kolonien von CC4412recA mit den Plasmiden pMC1403, pBN2, pFM52 und pFM54 wurden parallel auf Indikatoragar mit und ohne Selenit-Supplement ausgestrichen. Kolonien mit dem lac Vektor pMC1403 waren auf beiden Platten Lac⁻, Kolonien mit pBN2 (nicht seleniertes Fusionsprotein) waren stets Lac⁺. Dagegen zeigten Kolonien mit pFM52(54) (selenierte Fusionsproteine) nur auf Agar mit Selenit-Supplement Lac⁺ Phänotyp.

In entsprechenden Ausstrichen mit plasmidhaltigen Klonen von *E. coli* FM420 zeigte sich die Abhängigkeit des Lac-Phänotyps von supplementiertem Selenit nicht; wahrscheinlich reichte das im Fertigmedium bereits vorhandene Selenit vollkommen aus (nicht gezeigt). Die Ursache des unterschiedlichen Verhaltens ist wahrscheinlich in der höheren Selenitoleranz von *Salmonella* zu suchen, die in der Nahrungsmittelanalyse zur selektiven Anreicherung von *Salmonella* benutzt wird (98). Die höhere Toleranz bedingt vermutlich ihrerseits wiederum den Bedarf für höhere Selenitkonzentrationen im Medium, um die Versorgung physiologischer Prozesse mit Selen sicherzustellen.

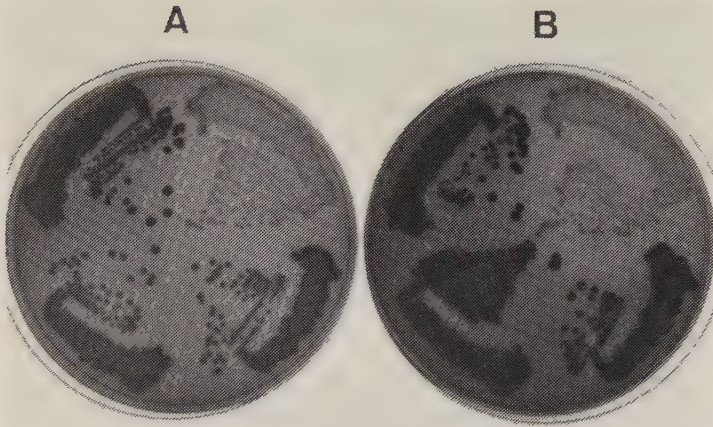


Abbildung 32:

Ausstriche von *S. typhimurium* CC4412recA mit verschiedenen fdhF-lacZ Plasmiden auf MacConkey Lactose Agar (A) ohne Selenit (B) mit 10 μ M Selenit.



- 1: pBN2
- 2: pMC1403
- 3: pFM52
- 4: pFM54

D I S K U S S I O N

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Selenoenzymen aus verschiedenen Organismen isoliert und charakterisiert (53, 163). In einigen dieser Proteine wurde Selenocystein als Selenokomponente identifiziert, über den molekularen Mechanismus des Einbaus von Selenocystein liegen aber keine genauen Daten vor. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Möglichkeiten der Inkorporation von Selenocystein in Proteine zu unterscheiden:

1. Es wird zuerst ein selenfreies Apoprotein gebildet, dieses wird nachträglich (post-translational) selektiert. Damit ergibt sich die Frage: Welche Aminosäure wird in Selenocystein umgewandelt bzw. gegen Selenocystein ausgetauscht?
2. Der Einbau von Selenocystein geschieht während der Translation (co-translational). Die Frage lautet dann: Gibt es für Selenocystein ein bestimmtes Codon oder ein im Strukturgens verschlüsseltes Signal, das den Einbau von Selenocystein steuert?

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Klonierung und die Sequenzierung des Strukturgens für das 80 kDa Selenoprotein der FDH_H aus *E. coli*. Im Vordergrund stand dabei die Absicht, in Zusammenarbeit mit Dr. Thressa Stadtman durch eine Feinstrukturanalyse des Selenoproteins einerseits und seines Strukturgens andererseits Einblick in den Einbaumechanismus der Selenkomponente in das Protein zu gewinnen.

Ausgangspunkt der Arbeit waren Befunde an einer FDH_H -negativen Mutante von *E. coli*, die aufgrund der Insertion des Phagen Mu d(Ap^r lac) im Gen fdhF statt des 80 kDa Wildtypselenoproteins ein verkürztes Selenopolypeptid synthetisierte (125). Es bestanden starke Hinweise, daß sich die Mu-Insertion im Strukturgen des Selenoproteins befand. Diese Mutante ermöglichte es, das fdhF Gen durch Komplementation zu klonieren und dadurch genauen Untersuchungen zugänglich zu machen.

Struktur des fdhF Gens und seiner genomischen Umgebung

In einer Serie von P1 Transduktionen wurde der Genort fdhF bei Minute 92.6 kartiert (4). Im Uhrzeigersinn ca. 0.75 min entfernt befindet sich das mel Operon. In dieser Region des *E. coli* Genoms waren bislang keine fdh Gene entdeckt worden, Barrett et al. (1984) fanden aber in *S. typhimurium* an homologer Position das Gen fhl, bei dem es sich vermutlich um das Gegenstück zu fdhF handelt.

Die Klonierung des fdhF Gens aus chromosomaler DNA des Stammes MC4100 führte zur Isolierung des Plasmids pFM3, das ein 6.2 kb BamHI Fragment mit dem fdhF Gen enthielt. Wu und Mandrand-Berthelot isolierten das fdhF Gen auf einem ColEI-Hybrid, das im Insert ebenfalls ein 6.2 kb BamHI Fragment aufwies (186). Die Mutanten FM909 und FM911, die kein 80 kDa Selenoprotein mehr bilden konnten, ermöglichten die Analyse plasmidkodierter Selenopolypeptide ohne störenden Hintergrund. In Anwesenheit des klonierten fdhF Gens wurde das 80 kDa Selenoprotein wieder synthetisiert, eine geringfügige Überexpression (ca. fünffach) konnte festgestellt werden.

Die Aktivität der FDH_H war aber trotz erhöhter Genkopienzahl nicht höher als im Wildtyp MC4100 (K. Forchhammer, pers. Mitteilung). Anscheinend limitierten

andere Komponenten, die zur BV-Reduktion beitragen. Um welche Faktoren es sich dabei handelt, wird die Analyse weiterer FDH_H -Mutanten zeigen müssen.

Das klonierte DNA-Segment wurde mit chromosomaler DNA des Wildtyps und zweier fdhF Mutanten rückhybridisiert, um Informationen zur Struktur des Gens und seiner genomischen Umgebung zu erhalten. Das Ergebnis dieser Untersuchungen kann man in drei Punkten zusammenfassen:

1. Das Chromosom von MC4100 enthält eine einzige Kopie des fdhF Gens. Die physikalischen Karten des genomischen und des klonierten fdhF Genlocus stimmen exakt überein. Rearrangements als Klonierungsartefakte können deshalb ausgeschlossen werden.
2. Die Lage der $\text{Mu d}(\text{Ap}^r \text{lac})$ Insertion im fdhF Gen der Mutante M9s korreliert mit der Größe des verkürzten Genprodukts (68 kDa).
3. Die Deletion im fdhF Genlocus der Mutante FM909, die durch die Exzision des Mu-Phagen entstanden war, ist größer als 6.2 kb; die genauen Grenzen der Deletion können aber nicht angegeben werden. Die Mutante wird durch ein 2.3 kb DNA-Fragment komplementiert, das nur das fdhF Gen enthält. Es kann deshalb ausgeschlossen werden, daß fdhF mit anderen Strukturgenen zusammen in einem Operon organisiert ist. Außerdem ist dem fdhF Gen ein eigener Promotor vorangestellt (A. Birkmann, pers. Mitteilung), und stromab findet sich ein rho-unabhängiger Transkriptionsterminator.

Das UGA Codon in fdhF und die Selenierung des Genprodukts

Die Sequenzierung des fdhF Gens brachte ein überraschendes Ergebnis. Es wurde zwar ein ausreichend großer offener Leserahmen gefunden, er enthielt aber an Aminosäureposition 140 ein UGA (Stopp) Codon. Das errechnete Molekulargewicht des Genprodukts von 79 200 Da harmonierte jedoch mit bekannten Literaturdaten (42). Die Aminosäurezusammensetzung des Proteins und die Häufigkeit der verwendeten Codons entsprach dem Standard von *E. coli* (47, 83). Für das Auftreten dieses internen UGA Codons gab es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

1. Es handelt sich um eine Mutation im fdhF Gen des Stammes MC4100, die als degenerative Folge der Kultivierung und Mutagenese im Labor auftrat.
2. Im ersten "Shotgun" Experiment wurde ein mutiertes fdhF Gen kloniert.
3. Die UGA Mutation entstand bei in vitro Manipulationen des klonierten fdhF Gens.
4. Das klonierte DNA-Segment kodiert nicht für ein 80 kDa Protein, sondern für andere Genprodukte.
5. Das UGA Codon steuert den co-translationalen Einbau von Selenocystein in die wachsende Polypeptidkette.

Als physiologisches Argument gegen die erste Möglichkeit spricht, daß die FDH_H -Aktivität in MC4100 mit der in anderen Substämmen von *E. coli* K-12 vergleichbar ist (145, 178). Zum anderen konnte mit fdhF-lacZ Fusionen gezeigt werden, daß das fdhF Genprodukt auch im zu *E. coli* verwandten Organismus *S. typhimurium* seleniert wird.

Um die zweite und dritte Möglichkeit zu überprüfen, ob dieses UGA Codon erst nachträglich in das fdhF Gen eingebracht worden war, wurde die Klonierung wiederholt. Die gesuchten Klone wurden jedoch nicht durch Komplementation, sondern im expressionsfreien Zustand durch Hybridisierung

identifiziert. In zwei parallelen Ansätzen wurden Vektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl und verschiedene Wirtsstämme (recA⁻/recA⁺) verwendet. In einem der Ansätze wurde ein inaktives fdhF Genfragment kloniert. Die DNA-Sequenzierung ergab aber in beiden Fällen die völlige Übereinstimmung mit der schon bekannten fdhF Sequenz.

Um zu beweisen, daß fdhF definitiv das Strukturgen des 80 kDa Selenoproteins darstellt, wurden zwei unterschiedliche Wege beschritten. Zum einen wurde das fdhF Gen in Maxizellen und in einem T7 RNA-Polymerase/Promotor System exprimiert. In beiden Systemen wurde ein Genprodukt mit 80 kDa nachgewiesen. Dieses Protein zeigte, unabhängig von der Markierung mit ³⁵S-Methionin oder mit ⁷⁵Se-Selenit, identisches Wanderungsverhalten auf SDS-Polyacrylamidgelen. Zum anderen wurde in vitro eine Serie von Derivaten des Plasmids pFM20 mit terminalen und internen Deletionen im fdhF Gen konstruiert, um die Größe der entsprechenden Genprodukte zu untersuchen. Dabei zeigte sich folgendes:

1. Die Größe der Selenopolypeptide korreliert strikt mit der Größe der jeweiligen offenen Leserahmen.
2. Es wurden noch fdhF Genprodukte seleniert, die nur mehr ein Drittel des Molekulargewichts des Wildtypselenoproteins aufweisen.
3. Die Translation von fdhF startet an einem AUG Codon stromauf vor dem UGA.

Die Ergebnisse dieser Experimente lieferten also bereits starke Hinweise auf das Überlesen des internen UGA in fdhF. Der endgültige Beweis wurde aber mit Hilfe von fdhF-lacZ Fusionen erbracht. Dazu wurde das lacZ Gen an drei verschiedenen Positionen in vitro mit dem fdhF Gen fusioniert; die Fusionsstellen befanden sich in pBN2 stromauf vor dem UGA, in pFM52 und pFM54 aber stromab vom UGA. Es kann in diesen Hybridgenen nur dann zur Bildung von Fusions-

proteinen kommen, wenn das interne UGA in fdhF translatiert wird. Dies ist auch der Fall, wie β -Galactosidase-Enzymtests und immunologische Versuche belegen. Darüber hinaus wird auch die Korrelation zwischen der Anwesenheit des UGA Codons in der fdhF-lacZ Fusion und der Selenierung des Hybridproteins sichtbar. Damit ergeben sich starke Indizien für die Bedeutung dieses UGA für den co-translationalen Einbau von Selen in das fdhF Genprodukt.

Der Seleneinbau in FDH_H erfolgt co-translational

Das 80 kDa FDH_H -Selenoprotein enthält Selenocystein, die Aminosäure wurde von T. Stadtman als Carboxymethylderivat im Säurehydrolysat eines chymotryptischen Peptids identifiziert (192). Basierend auf der Annahme eines co-translationalen Einbaumodus für Selen sind zwei Möglichkeiten denkbar:

1. Das UGA Codon bewirkt einen vorübergehenden Halt des translatierenden Ribosoms und ermöglicht es dadurch den Enzymen des "selenierenden Systems", an der wachsenden Polypeptidkette in situ eine kurz zuvor eingebaute Aminosäure in Selenocystein umzuwandeln.
2. UGA fungiert in einer besonderen Umgebung nicht als Stoppcodon, sondern steht für Selenocystein und paart bei der Translation hochspezifisch mit einer besonderen Suppressor-tRNA, die mit Selenocystein oder dessen Vorläufer beladen ist.

Als grundlegende logische Konsequenz eines co-translationalen Einbauprozesses ist aber zu fordern, daß die Translation unter Selenmangelbedingungen am internen UGA in fdhF terminiert. Entsprechende Hinweise wurden von A. Birkmann gefunden. In Zellen mit fdhF-lacZ Fusionen war das Überlesen von UGA an die ausreichende Supplementierung mit

Selen gebunden. Unter Mangelbedingungen sank die Aktivität der β -Galactosidase auf unter 10 % des Kontrollwerts. Die Transkription des fdhF Gens wurde durch die Verfügbarkeit von Selen dagegen nicht beeinflusst. Immunologische Experimente beweisen, daß die stark verringerte β -Galactosidaseaktivität auf den Abbruch der Translation in fdhF zurückzuführen ist. In Zellen, die unter Selenmangelbedingungen wachsen, konnte kein β -Galactosidaseprotein detektiert werden. Diese Befunde wurden an fdhA-Mutanten bestätigt, die Selen nicht mehr in FDH_N und FDH_H inkorporieren können. Transformiert man Plasmide mit fdhF(UGA)-lacZ Fusionen in diese Mutanten, wird keine β -Galactosidase gebildet. Ist dagegen das lacZ Gen stromauf vom UGA an fdhF fusioniert, wird die Synthese der β -Galactosidasehybride unabhängig vom selenierenden System der Zelle.

Auf der Grundlage der beiden oben genannten Hypothesen ergab sich als Ansatzpunkt für das weitere Vorgehen, das UGA Codon durch gezielte Mutagenese zu verändern und die Folgen für die Selenierung des fdhF Genprodukts zu untersuchen. Das Ergebnis der Mutageneseexperimente kann in drei Punkten zusammengefaßt werden:

1. Es spielt eine große Rolle, an welcher Position des Triplets das UGA Codon verändert wird. Ein Austausch in der Mittelposition (UGA $\rightarrow$ UCA) bewirkt den Ausfall der Selenierung; statt Selenocystein wird Serin in das fdhF Genprodukt eingebaut. Austausche in der "wobble" Position (UGA $\rightarrow$ UGC bzw. UGU) lassen noch partielle Selenierung zu (5 - 10 % des Wildtyps), überwiegend wird aber Selenocystein durch Cystein ersetzt.
2. Veränderungen im UGA Triplet führen zu einer erhöhten Translationsrate des fdhF Gens. Gleichzeitig wird die Expression von fdhF vom selenierenden System unabhängig.

3. Der Austausch von UGA gegen das Serincodon UCA führt zu enzymatisch inaktiver FDH_H . Dagegen ist die FDH_H -Variante mit Cystein anstelle von Selenocystein enzymatisch noch aktiv; die Aktivität sinkt auf ca. 10 % des Wildtyps.

Die Analyse dieser Ergebnisse führt zu interessanten Schlußfolgerungen. Ausgangspunkt der Überlegungen ist die Hypothese, UGA sei in fdhF das Codon für Selenocystein.

Basenaustausche in der dritten ("wobble") Position des UGA-Tripletts führen bei der Translation zu Verdrängungseffekten zwischen der nun kognaten tRNA^{Cys} und der noch teilweise kognaten (hypothetischen) $\text{tRNA}^{\text{SeCys}}$. Dabei ist anzunehmen, daß die $\text{tRNA}^{\text{SeCys}}$ nicht nur UGA, sondern auch Sequenzen in seiner Nachbarschaft erkennt; anders ist die hohe Spezifität des Seleneinbaus kaum zu erklären. Durch die Konkurrenz zweier verschiedener tRNAs wird nur noch in einen Teil der wachsenden Polypeptidketten Selenocystein inkorporiert. Der andere Teil enthält an dieser Position statt dessen Cystein. Die in *E. coli* einzige bisher bekannte tRNA^{Cys} besitzt das Anticodon GCA (63) und kann nach der "wobble" Hypothese (43) gleichermaßen mit UGC und UGU paaren. Übereinstimmend wurde gefunden, daß in den fdhF Varianten mit diesen Codons die Selenierungsrate der Genprodukte im Vergleich zum Wildtyp um denselben Betrag abnimmt.

Wegen eines Defekts im Genlocus fdhA inkorporiert die Mutante WL31153 kein Selenocystein in Proteine; die Translation von fdhF terminiert deshalb am internen UGA. Nach Umwandlung in UGC bzw. UGU wird die Translation in fdhF vom selenierenden System unabhängig. WL31153 bildet ausschließlich die cysteinhaltige Variante des 80 kDa Proteins, dessen enzymatische Aktivität deutlich niedriger als die des Wildtyps ist. Das bedeutet, daß das Seleno-

protein der FDH_H zwar auch ohne Selen funktionsfähig sein kann, jedoch mit Selen wesentlich bessere katalytische Eigenschaften besitzt.

Der Basenaustausch in der Mittelposition des UGA Triplets hat hingegen den Einbau von Serin statt Selenocystein zur Folge. In diesem Fall unterbleiben bei der Translation Konkurrenzreaktionen verschiedener tRNAs, weil anscheinend nur mehr die tRNA^{Ser} effizient mit der mRNA paaren kann. Das resultierende Genprodukt ist selenfrei und enzymatisch inaktiv. Die Synthese des mutierten Genprodukts konnte dabei immunologisch bestätigt werden (K. Forchhammer, pers. Mitteilung).

Nach dem Austausch von Selenocystein gegen Cystein oder Serin sinkt die FDH_H -Aktivität auf ein Zehntel bzw. auf Null. Bei der Strukturanalyse der drei Aminosäuren ergeben sich interessante Parallelen in der Veränderung der Seitengruppe: von $-\text{SeH}$ über $-\text{SH}$ zu $-\text{OH}$. Die Selenolgruppe ist im Gegensatz zu SH/OH Gruppen bei physiologischem pH dissoziiert und damit deutlich reaktiver (80). Die partielle Aktivität der cysteinhaltigen FDH_H -Variante beruht möglicherweise auf der Isosterie von Selenol- und Sulfhydrylgruppen (155). Die ganz andere Ladungsdichte und Größe der OH-Gruppe des Serins bedingt wahrscheinlich den Ausfall der FDH_H -Aktivität.

Die eingangs dargestellte alternative Hypothese, nach der dem UGA als Stoppcodon eine Bedeutung für den co-translationalen Einbau von Selenocystein zukommt ("pausierende Ribosomen"), ist eher unwahrscheinlich. Entsprechend dieser Annahme sollte jede Basenänderung im UGA Triplet in ein Aminosäurecodon den völligen Ausfall der Selenierung des 80 kDa Proteins bewirken. Das steht aber ganz eindeutig im Widerspruch zu den gezeigten Versuchsergebnissen. Diese liefern vielmehr starke Hinweise darauf, daß in E. coli das UGA Codon, das normalerweise den Abbruch der Translation

signalisiert, in einem besonderen genetischen Context das Codon für die seltene Aminosäure Selenocystein ist. Der endgültige Beweis wird aber erst möglich sein, wenn in vitro mit gereinigten Komponenten der co-translationalen Einbau von Selenocystein gezeigt werden kann.

Auch das Gen für Glutathionperoxidase der Maus enthält ein UGA Codon (21). Proteinsequenzierungen der Enzyme aus Ratte (38) und Rind (70) ergaben, daß sich an der entsprechenden Position im Protein ein Selenocysteinrest befindet. Wie an der Glutathionperoxidase der Ratte gezeigt wurde, leitet sich das Kohlenstoffgerüst von Selenocystein von Serin ab (168); dabei wird die OH-Gruppe des Serins gegen eine SeH-Gruppe ausgetauscht. Es wurden in verschiedenen Säugetieren bestimmte Seryl-tRNAs gefunden, die UGA erkennen (74). In diesen Systemen wird Serin nach der Aminoacylierung an diesen Suppressor-tRNAs durch eine spezifische Kinase an der OH-Gruppe phosphoryliert (115). Es wäre also leicht vorstellbar, daß in einem letzten Schritt die Konversion in Selenocystein stattfindet, entweder noch an der tRNA oder kurz nach dem Einbau von Phosphoserin in die Polypeptidkette. Ein solcher Mechanismus würde auch erklären, warum zum einen Selen aus anorganischen Verbindungen rasch in Glutathionperoxidase eingebaut wird (169), und warum zum anderen in Säugetieren bislang die Synthese von freiem Selenocystein aus anorganischen Vorläufern nicht nachgewiesen wurde (57).

Das Modell des Einbaus von Selenocystein via Phosphoserin ist zweifellos auch für prokaryontische Systeme attraktiv. Ein Vergleich des Gens für die Glutathionperoxidase der Maus (21) und des fdhF Gens aus *E. coli* zeigt allerdings, daß die Umgebung des UGA Codons weder auf DNA-Ebene noch auf Proteinebene konserviert ist (Abb. 33).

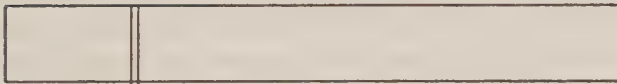
GLUTATHION-PEROXIDASE (Maus)



19 kDa

AAT GTC GCG TCT CTC TGA GGC ACC ACG ATC CGG
Asn Val Ala Ser Leu Sec Gly Thr Thr Ile Arg

FORMIAT-DEHYDROGENASE (E. coli)



80 kDa

TGC TGC GCT CGT GTC TGA CAC GGC CCA TCG GTT
Cys Cys Ala Arg Val Sec His Gly Pro Ser Val

Abbildung 33:

Vergleich der Gene für Glutathionperoxidase (Maus) und Formiatdehydrogenase (E. coli) in der Umgebung des UGA Codons. Sec: Selenocystein.

Es lassen sich deshalb keine Hinweise auf konservierte Signalsequenzen in den Strukturgenen zu ableiten, die den Einbau von Selenocystein steuern.

Untersuchungen zur heterologen Expression des eukaryontischen Gens in *E. coli* haben vielmehr ergeben, daß die Translation am UGA terminiert, weil es im prokaryontischen Organismus nicht als Selenocysteincodon erkannt wird (Dr. A. Oppenheim, pers. Mitteilung). Nachdem aber das fdhF Gen aus *E. coli* im verwandten Organismus *S. typhimurium* normal exprimiert wird und bei der Translation der Einbau von Selenocystein erfolgt, scheinen Pro- und Eukaryonten verschiedene Komponenten für die Seleninkorporation in Proteine zu besitzen, obwohl der grundlegende Mechanismus identisch ist. Diese Faktoren arbeiten hochspezifisch und unterscheiden sich wesentlich von üblichen Suppressoren. Damit ist vermutlich auch zu erklären, warum in Anwesenheit des starken UGA-Suppressors sup-9 die Translation des UGA Codons nicht von der Selenierung des fdhF Genprodukts entkoppelt werden konnte. Da die Suppressionsrate aber auch von der Umgebung des UGA Codons abhängt (114), können negative Einflüsse des Codoncontexts in fdhF auf den sup-9 Suppressor nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

Einfluß des selenierenden Systems auf die Synthese des fdhF Genprodukts

Die Synthese des 80 kDa Selenoproteins der FDH_H wird auf der Ebene der Transkription reguliert. Expression erfolgt nur unter Gärungsbedingungen, in Abwesenheit von Sauerstoff und anderen Elektronenakzeptoren (42, 125, 126). Dagegen ist die Synthese der Komponenten des selenierenden Systems nicht durch Sauerstoff reprimiert, vermutlich ist sie sogar konstitutiv. Zellen, in denen das fdhF Gen unter der Kontrolle des lac Promotors exprimiert wurde, inkorporieren

auch unter aeroben Bedingungen markiertes Selen in das 80 kDa Protein. In der konstitutiven Selenierung ist der Grund zu sehen, warum die Bildung des 80 kDa Proteins in Maxizellen ebenfalls in Anwesenheit von Sauerstoff nachgewiesen werden konnte. Wie die Ergebnisse mit nicht selenierenden Mutanten (fdhA) übereinstimmend belegen, ist die Translation des fdhF-internen UGA Codons von einem funktionellen Selenierungssystem abhängig.

Die konstitutive Synthese dieser Komponenten ist jedoch für die Zellen keine große metabolische Last. Da in *E. coli* nur zwei von etwa 3 000 Proteinen seleniert werden, kann die Kapazität des selenierenden Systems entsprechend niedrig ausgelegt werden. Aus diesem Grund wohl wurde auch nie eine deutliche Überexpression des 80 kDa Selenoproteins erreicht. Die Syntheserate nahm maximal um einen Faktor fünf zu, auch wenn das fdhF Gen in 60 bis 100 Kopien pro Zelle vorlag. Autoregulatorische Phänomene können dabei ausgeschlossen werden (A. Birkmann, pers. Mitteilung). Die Verwendung starker Promotoren hatte einen eher ungünstigen Einfluß auf die Höhe der Syntheserate des 80 kDa Selenoproteins.

Physiologisch betrachtet ist das fdhF Gen also auf niedrige Expression ausgelegt. So ist auch zu erklären, warum im Test auf Gasbildung volle Komplementation schon dann festzustellen war, wenn das fdhF Gen (ohne eigenen Promotor) von entfernten Plasmidpromotoren aus oder durch die Hintergrundaktivität des vorgeschalteten lac Promotors transkribiert wurde. Im Falle von lac (pFM28) brachte nur eine geringe Zugabe des Induktors IPTG (0.1 mM) eine Erhöhung der Syntheserate, bei Zugabe von 1 mM IPTG hingegen wurde bereits eine leichte Abnahme der Syntheserate (!) im Vergleich zum nicht induzierten Zustand des lac Promotors beobachtet.

Ein ähnliches Phänomen wurde auch im T7 Expressionssystem beobachtet. Obwohl in diesem System genügend mRNA gebildet wird (166), war die Syntheserate des 80 kDa Selenoproteins im induzierten und nichtinduzierten Zustand gleich niedrig. Dafür häufte sich nach Induktion ein 15 kDa Protein an, weil die Translation in den meisten Fällen am internen UGA in fdhF terminierte. Die Existenz dieses verkürzten Genprodukts ist ein weiteres wichtiges Indiz für den co-translationalen Seleneinbau. Die Expression des fdhF(UCA) Gens im T7 System führte dagegen ausschließlich zur Bildung eines 80 kDa Proteins. Die Syntheserate lag in diesem Fall wesentlich höher als die des Wildtypproteins (K. Forchhammer, pers. Mitteilung).

Wie diese Beispiele zeigen, ist die effiziente Synthese des FDH_H -Selenoproteins vom Gleichgewicht mehrerer Faktoren abhängig. Es wäre deshalb eine interessante Frage, ob bei einer Überexpression all dieser Komponenten auch eine drastisch höhere Syntheserate des 80 kDa Selenoproteins möglich wäre.

Strukturvergleich der Formiat-Dehydrogenasen aus *E. coli* und *Methanobacterium formicum*

FDH aus *M. formicum* besitzt im Gegensatz zum Enzym aus *E. coli* keine Selenkomponente. Das Protein besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten und enthält Molybdän, Zink, Eisen-Schwefel-Zentren und FAD (8, 146). Als Cofaktor dient F_{420} , das in bisher allen Methanogenen gefunden wurde. Die beiden Strukturgene sind kloniert und sequenziert (157). Sie kodieren für Untereinheiten mit 75 und 44 kDa Molekulargewicht. Der Vergleich der großen Untereinheit mit dem 80 kDa Selenoprotein der FDH_H aus *E. coli* zeigt die ausgeprägte strukturelle Verwandtschaft der beiden Proteine (Abb. 34). 38 % der Aminosäuren sind konserviert, im Mittelteil der Proteine sind es 48 %. An 9 % der Positionen

Ec M K K K V V T V C P Y C A S G C K I N L V V D N G K I V R A E A A Q G K
Mbf M D I K Y V P T I C P Y C G V G C G M N L V V K D E K V V G V E P W K R H

Ec T N Q G T L C L K G Y Y G W D F I N D T Q I L T P R L K T P M I R R Q R G
Mbf V N E G K L C P K G N F C Y E I I H R E D - - - - R L T T P - - - - -

Ec G K L E P V S W D E A L N Y V A E R L S A I K E K Y G P D A I Q T T G S S
Mbf L I K E N G E F R E A T W D E A Y D L I A S K L G A Y D P N E I G F F C C

Ec R G T G N E T N Y V M Q K F A R A V I G T N N V D C C A R V Z H G P S V A
Mbf A R S P N E N I Y V N Q K F A R I V V G T H N I D H C A R L C H G P T V A

Ec G L H Q S V G N G A M S N A I N E I D N T D L V F V F G Y N P A D S H P I
Mbf G L A A S F G S G A M T N S Y A S F E D A D L I F S I G A N S L E A H P L

Ec V A N H V I N A K R N G A K I I V C D P R K I E T A R I A D M H I A L K N
Mbf V G R K L M R A K M N G A Y F I V A D P R Y T P T A K Q A D Q Y I P F K T

Ec G S N I A L L N A M G H V I I E E N L Y D K A F V A S R T E G F E E Y R K
Mbf G T D V A L M N A M M N V I I S E G L E D K E F I E K R T K N Y E E L K E

Ec I V E G Y T P E S V E D I T G V S A S E I R Q A A R M Y A Q A K S A A I L
Mbf V V S K Y T P E M A E E I T Q V P A D V I R D I A I K Y A K A D K A A I V

Ec W G M G V T Q F Y Q G V E T V R S L T S L A M L T G N L G K P H A G V N P
Mbf Y S L G I T E H S H G V D N V M Q T A N L A M L T G N I G R L G T G V N P

Ec V R G Q N N V Q G A C D M G A L P D T Y P G Y Q Y V K D P A N R E K F A K
Mbf L R G Q N N V Q G A C D M G A L P T D Y P G Y R K V A D Q E V M E D V T C

Ec A W G V E S L P A H T G Y R I S E L P H R A A H G E V R A A Y I M G E D P
Mbf T W G C S D L G C E P G L K I F E M I D A A A K G D L K V L Y I T G E D P

Ec L Q T D A E L S A V R K A F E D L E L V I V Q D I F M T K T A S A A D V I
Mbf V I S D P D T H H V E E A L N N L D F F V V Q D I F M T D T A E F A D V V

Ec L P S T S W G E H E G V F T A A D R G F Q R F F K A V E P K W D L K Y D W
Mbf L P A A C W A E Q E G T F T N G E R R V Q L I R K A V D A P G S L K Y D W

Ec Q I I S E I A T R M G Y P M H Y N N T Q E I W D E L R H L C P D F Y G A T
Mbf E I F C D L A K K M G A D P E M F T Y E S A Q D I F E E V R T V T P Q Y A

Ec Y E K M G E L G F I Q W P C R D T S D A D Q G T S Y L F K E K F D T P N G
Mbf G M N R E R L D R P E A L H W P C P S E D H P G T A M M H I E K F A H P D

Ec L A Q F F T C D W V A P I D K L T D E Y P M V L S T V R E V G H Y S C R S
Mbf G L G I F M P L E E Q G P M E T P D D E Y P L I L T T T R L L F H Y H A A

Ec M T G N C A A L A A L A D E P G Y A Q I N T E D A K R L G I E D E A L V W
Mbf M T R R A A T L D R E V P T - G Y V E I N T E D A A E L G I A N E K E K V K

Ec V H S R K G K I I T R A Q V S D R P N K G A I Y M T Y Q W W I G A C N E L
Mbf V K S R R G E I E I A A R V T D D I V K G I V N I P M H F R E C S A N I L

Ec - V T E N L S P I T K T P E Y K Y C A V R V E P I A D Q R A A E Q Y V I D
Mbf T N A A A I D P K S G M P E Y K A C A V A I S K M E G S K B *

Ec Y N K L K T R L R E A A L A *

Abbildung 34:

Vergleich der Aminosäuresequenzen der Formiatdehydrogenase-Untereinheiten aus *E. coli* (Ec) und *Methanobacterium formicicum* (Mbf). Aminosäuren abgekürzt nach dem IUPAC Code, außer Z: Selenocystein.

finden sich sogenannte konservative Aminosäureaustausche, z.B. Leucin gegen Valin. Etwas überraschend befindet sich im archaebakteriellen Protein ein Cysteinrest an der homologen Position, an der im Selenoprotein von *E. coli* Selenocystein vorkommt. Anders als bei der Glutathionperoxidase ist in beiden FDHs auch die Umgebung dieser Aminosäure stark konserviert. Es muß also andere Faktoren geben, die es *M. formicicum* erlauben, anders als *E. coli* auf Selenocystein in der FDH verzichten zu können.

Selenoenzyme wurden bei Prokaryonten bisher ausschließlich in fakultativ und obligat anaeroben Organismen gefunden. Es könnte sich beim Triplet UGA also um ein Codon handeln, das in früheren Zeiten der Evolution das Aminosäurecodon für Selenocystein war. In aerob lebenden Organismen wurde später Selenocystein nach und nach durch das weniger sauerstoffempfindliche Schwefelanalogue Cystein ersetzt, und aus UGA wurde ein Stopcodon. Gerade dieses Codon scheint im genetischen Code Variationen zu unterliegen, in Mycoplasmen (188) und Hefemitochondrien (9) steht UGA für Tryptophan. Um die Bedeutung des UGA Codons für den Einbau von Selenocystein in Prokaryonten auf eine breitere Grundlage zu stellen, wird es sicher nützlich sein, die Gene verschiedener Selenoproteine zu klonieren, zu sequenzieren und ihre Expression zu untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Selen in Form von Selenocystein ist integraler Bestandteil einer Reihe von Proteinen in Pro- und Eukaryonten. Die einzigen Selenoenzyme in *Escherichia coli* sind zwei Formiatdehydrogenasen, FDH_N und FDH_H . FDH_N ist Bestandteil des Nitratreduktase-Komplexes, FDH_H des Formiathydrogenlyasekomplexes. Die Biochemie des Seleneinbaus allgemein und die funktionelle Rolle des Selenocysteinrestes in diesen beiden Enzymen sind bisher nicht untersucht.

Das Gen fdhF in *E. coli* kodiert für das 80 kDa Selenoprotein der FDH_H . Wie die genetische Kartierung ergab, befindet sich fdhF bei Minute 92.4 auf dem *E. coli* Chromosom. Es handelt sich bei fdhF um ein singuläres Gen, das nicht mit anderen fdh Genen in einem Operon organisiert ist.

Um den Mechanismus der Selenierung zu analysieren, wurde das fdhF Gen in einen Plasmidvektor kloniert. Das klonierte Gen komplementiert fdhF-negative Mutanten und bewirkt in Maxizellen die Synthese eines Proteins von 80 kDa. Terminale und interne Deletionen in fdhF resultieren in verkürzten und noch selenierbaren Genprodukten.

Die Sequenzierung des fdhF Gens ergab einen offenen Leserahmen von 2145 Nucleotiden, der für ein Protein mit 715 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 79 200 Da kodiert. fdhF enthält ein "in-frame" UGA (Stopp) Codon an der Position der Aminosäure 140.

Es wurden fdhF-lacZ Fusionen konstruiert, wobei das lacZ Gen an verschiedenen Stellen im fdhF Gen anfusioniert wurde. Die Translation dieser Genfusionen erfordert die Anwesenheit von Selen im Medium, wenn der fdhF Anteil UGA₁₄₀ enthält. Sie ist unabhängig von Selen, wenn das lacZ Gen weiter stromauf an fdhF fusioniert ist. Bei Selenmangel terminiert die Translation am UGA₁₄₀ und es entsteht nur ein verkürztes Genprodukt von 15 kDa.

Pleiotrope Mutanten mit Defekten in fdhA und fdhB können Selen in Proteine bzw. in tRNA nicht mehr einbauen. In diesen Mutanten wird kein 80 kDa fdhF Genprodukt gebildet, da die Translation von fdhF am internen UGA Codon terminiert.

Mittels lokalisierter Mutagenese wurde UGA₁₄₀ in ein Codon für Serin (UCA) bzw. in Codons für Cystein (UGC bzw. UGU) umgewandelt. Jede dieser Mutationen bewirkt Selenunabhängigkeit der Translation von fdhF. Je nach der Position des Basenaustausches im UGA-Triplett ergeben sich unterschiedliche Folgen für den Seleneinbau in das 80 kDa fdhF Polypeptid. Ein Austausch in der Mittelposition (UGA → UCA) bewirkt den Ausfall der Selenierung; Austausche in der "wobble" Position (UGA → UGC bzw. UGU) lassen noch partielle Selenierung zu.

Der Austausch von UGA gegen ein Serincodon führt zu enzymatisch inaktiver FDH_H. Dagegen ist die FDH_H-Variante mit Cystein anstelle von Selenocystein enzymatisch noch partiell aktiv.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, daß ein UGA (Stopp) Codon in einer besonderen genetischen Umgebung den co-translationalen Einbau von Selenocystein in das fdhF Genprodukt determiniert.

L I T E R A T U R

1. **Abou-Jaoude A**, Pascal M-C, Chippaux M (1979)
Eur J Biochem 95: 315-321.
2. **An G**, Friesen JD (1979)
J Bacteriol 140: 400-407.
3. **Bachmann BJ** (1972)
Bacteriol Rev 36: 525-557.
4. **Bachmann BJ** (1983)
Microbiol Rev 47: 180-230.
5. **Baker TA**, Howe MM, Gross CA (1983)
J Bacteriol 156: 970-974.
6. **Bankaitis VA**, Bassford PJ (1982)
J Bacteriol 151: 1346-1357.
7. **Bankier AT**, Barrell BG (1983)
Techniques in the Life Sciences, Vol. B5,
Shotgun DNA Sequencing (B508): 1-34.
Elseviers Science Publishers, BV.
8. **Barber MJ**, Siegel LM, Schauer NL, May HD, Ferry JG
(1983)
J Biol Chem 258: 10839-10845.
9. **Barrell BG**, Bankier AT, Drouin J (1979)
Nature 282: 189-194.
10. **Barrett EL**, Jackson CE, Fukumoto HT, Chang GW (1979)
Mol Gen Genet 177: 95-101.
11. **Barrett EL**, Kwan HS, Macy J (1984)
J Bacteriol 158: 972-977.
12. **Barrett EL**, Riggs DL (1982)
J Bacteriol 149: 554-560.
13. **Begg YA**, Whyte JA, Haddock BY (1977)
FEMS Microbiol Lett 2: 47-50.
14. **Benson SA** (1984)
Biotechniques 2: 66-68.

15. **Biggin MD, Gibson T, Hong GF (1983)**
Proc Natl Acad Sci USA 80: 3963-3965.
16. **Bilous PT, Weiner JH (1985)**
J Bacteriol 162: 1151-1155.
17. **Birkmann A, Zinoni F, Sawers G, Böck, A (1986)**
Arch Microbiol: in press.
18. **Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC,
Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977)**
Gene 2: 95-113.
19. **Casadaban MJ, Chou J, Cohen SN (1980)**
J Bacteriol 143: 971-980.
20. **Casadaban MJ, Cohen SN (1979)**
Proc Natl Acad Sci USA 76: 4530-4533.
21. **Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W,
Harrison PR (1986)**
EMBO J 5: 1221-1227.
22. **Chang ACY, Cohen SN (1978)**
J Bacteriol 134: 1141-1156.
23. **Ching W-M (1984)**
Proc Natl Acad Sci USA 81: 3010-3013.
24. **Ching W-M, Alzner-DeWeerd B, Stadtman TC (1985)**
Proc Natl Acad Sci USA 82: 347-350.
25. **Ching W-M, Stadtman TC (1982)**
Proc Natl Acad Sci USA 79: 374-377.
26. **Ching W-M, Wittwer AJ, Tsai L, Stadtman TC (1984)**
Proc Natl Acad Sci USA 81: 57-60.
27. **Chippaux M, Casse F, Pascal M-C (1972)**
J Bacteriol 110: 766-768.
28. **Chippaux M, Pascal M-C, Casse F (1977)**
Eur J Biochem 72: 149-155.
29. **Chow LT, Bukhari AI (1977)**
in: DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes.
Bukhari AI, Shapiro JA, Adhya SL (eds) Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 295-
306.
30. **Chow LT, Bukhari AI (1978)**
Gene 3: 333-346.

31. **Chumley** FG, Menzel R, Roth JR (1979)
Genetics 91: 639-655.
32. **Clark** AJ, Chamberlin M, Boyce RP, Howard-Flanders P
(1966)
J Mol Biol 19: 442-454.
33. **Clark-Curtiss** JE, Curtiss III R (1983)
Methods Enzymol 101: 347-362.
34. **Clewell** DB (1972)
J Bacteriol 110: 667-676.
35. **Clewell** DB, Helinski D (1969)
Proc Natl Acad Sci USA 62: 1159-1166.
36. **Coch** EH, Greene RC (1971)
Biochim Biophys Acta 230: 223-236.
37. **Cole** JA, Wimpenny JWT (1966)
Biochim Biophys Acta 128: 419-425.
38. **Condell** RA, Tappel AL (1982)
Biochim Biophys Acta 709: 304-309.
39. **Cone** JE, Martin del Rio R, Davis JN, Stadtman TC (1976)
Proc Natl Acad Sci USA 73: 2659-2663.
40. **Covarrubias** L, Cervantes L, Covarrubias A, Soberon X,
Vichudo J, Blanco A, Kupersztosch-Portnoy YM, Bolivar
F (1981)
Gene 13: 25-35.
41. **Cowie** DB, Cohen GN (1957)
Biochim Biophys Acta 26: 252-261.
42. **Cox** JC, Edwards ES, DeMoss JA (1981)
J Bacteriol 145: 1317-1324.
43. **Crick** FHC (1966)
J Mol Biol 19: 548-555.
44. **Csonka** LN (1981)
Mol Gen Genet 182: 82-86.
45. **Csonka** LN, Clark A (1980)
J Bacteriol 143: 529-530.
46. **Davis** RW, Botstein D, Roth JR (1980)
Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

47. **Dayhoff** MO, Hunt LT, Hurst-Calderone S (1978)
in: Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff
MO (ed) Vol. 5, Suppl 3: 363-369.
48. **DeBruijn** FJ, Bukhari AI (1978)
Gene 3: 315-318.
49. **Douglas** MW, Ward FB, Cole JA (1974)
J Gen Microbiol 80: 557-560.
50. **Dreiseikelmann** B, Eichenlaub R, Wackernagel W (1979)
Biochim Biophys Acta 562: 418-428.
51. **Dretzen** G, Bellare M, Sassone-Cossi P, Chambon P (1981)
Anal Biochem 112: 295-298.
52. **Drews** G (1976)
Mikrobiologisches Praktikum, Springer Verlag.
53. **Dürre** P, Andreesen JR (1986)
BIUZ 16: 12-23.
54. **Enoch** HG, Lester RL (1972)
J Bacteriol 110: 1032-1040.
55. **Enoch** HG, Lester RL (1975)
J Biol Chem 250: 6693-6705.
56. **Eriksson-Grennberg** KG (1968)
Genet Res 12: 147-156.
57. **Esaki** N, Nakamura T, Tanaka H, Suzuki T, Morino Y,
Soda K (1981)
Biochemistry 20: 4492-4496.
58. **Flohe** L, Günzler WA, Loschen G (1979)
in: Trace Metals in Health and Disease, Kharasch N
(ed) Raven Press, NY, pp. 263-286.
59. **Flohe** L, Günzler WA, Schock HH (1973)
FEBS Lett 32: 132-134.
60. **Forstrom** JW, Zakowski JJ, Tappel AL (1978)
Biochemistry 17: 2639-2644.
61. **Fraenkel** DG, Neidhardt FC (1961)
Biochim Biophys Acta 53: 96-100.
62. **Garoff** H, Ansorge W (1981)
Anal Biochem 115: 450-457.
63. **Gauss** DH, Sprinzl M (1983)
Nucleic Acids Res 11: r1-r53.

64. **Giordano G**, Medani C-L, Mandrand-Berthelot M-A, Boxer DH (1983)
FEMS Microbiol Lett 17: 171-177.
65. **Glaser JH**, DeMoss JA (1972)
Mol Gen Genet 116: 1-10.
66. **Graham A**, Jenkins HE, Smith NH, Mandrand-Berthelot M-A, Haddock BA, Boxer DH (1980)
FEMS Microbiol Lett 7: 145-151.
67. **Gray CP**, Sommer R, Polke C, Beck E, Schaller H (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 50-53.
68. **Gray CT**, Wimpenny JWT, Hughes DE, Mossman MR (1966)
Biochim Biophys Acta 117: 22-32.
69. **Gray CT**, Wimpenny JWT, Mossman MR (1966)
Biochim Biophys Acta 117: 33-41.
70. **Günzler WA**, Steffens GJ, Grossmann A, Kim S-MA, Ötting F, Wendel A, Flohe L (1984)
Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 365: 195-212.
71. **Haddock BA**, Jones CW (1977)
Bacteriol Rev 41: 47-99.
72. **Haddock BA**, Mandrand-Berthelot M-A (1982)
Biochem Soc Trans 10: 478-480.
73. **Hanahan D** (1983)
J Mol Biol 166: 557-580.
74. **Hatfield D** (1985)
Trends Biol Sci 10: 201-204.
75. **Hawkes WC**, Tappel AL (1983)
Biochim Biophys Acta 739: 225-234.
76. **Hawley DK**, McClure WR (1983)
Nucleic Acids Res 11: 2237-2255.
77. **Hirsh D** (1971)
J Mol Biol 58: 439-458.
78. **Hoffmann JL**, McConnell KP (1974)
Biochim Biophys Acta 366: 109-113.
79. **Howe JG**, Hershey JWB (1981)
J Biol Chem 256: 12836-12839.
80. **Huber RE**, Criddle RS (1967)
Arch Biochem Biophys 122: 164-173.

81. Huber RE, Criddle RS (1967)
Biochim Biophys Acta 141: 587-599.
82. Hummel H, Piepersberg W, Böck A (1979)
Mol Gen Genet 169: 345-347.
83. Ikemura T (1981)
J Mol Biol 151: 389-409.
84. Ingledew WJ, Poole RK (1984)
Microbiol Rev 48: 222-271.
85. Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984)
Gene Anal Technol 1: 3-8.
86. Jones JB, Dilworth GL, Stadtman TC (1979)
Arch Biochem Biophys 195: 255-260.
87. Kleckner N, Barker DF, Ross DG, Botstein D, Swan IA,
Zabeau M (1978)
Genetics 90: 427-461.
88. Kleckner N, Roth J, Botstein D (1977)
J Mol Biol 116: 125-159.
89. Koenen M, Griesser H-W, Müller-Hill B (1985)
in: DNA Cloning, Vol I. Glover DM (ed)
IRL Press, Oxford, pp. 89-100.
90. Kramer W, Drutsa V, Jansen H-W, Kramer B, Pflugfelder
M, Fritz H-J (1984)
Nucleic Acids Res 12: 9441-9456.
91. Kramer W, Fritz H-J (1987)
Methods Enzymol 155: in press.
92. Kupersztoch YM, Helinski DR (1973)
Biochem Biophys Res Comm 54: 1451-1459.
93. Ladenstein R, Epp, O, Günzler WA, Flohe L (1983)
Life Chemistry Reports 1: 1-19.
94. Laemmli UK (1970)
Nature 227: 680-685.
95. Lambden P, Guest JR (1976)
J Gen Microbiol 97: 145-160.
96. Lederberg E, Cohen SN (1974)
J Bacteriol 119: 1072-1074.
97. Lee JH, Patel P, Sankar P, Shanmugam KT (1985)
J Bacteriol 162: 344-352.

98. **Leifson E** (1936)
Am J Hyg 24: 423-432.
99. **Lennox ES** (1955)
Virology 1: 190-206.
100. **Lester RL, DeMoss JA** (1971)
J Bacteriol 105: 1006-1014.
101. **Low B** (1973)
J Bacteriol 113: 798-812.
102. **Lyons LB, Zinder ND** (1972)
Virology 49: 45-60.
103. **MacDonald H, Pope NR, Cole JA** (1985)
J Gen Microbiol 131: 2771-2782.
104. **Maloy S, Nunn W** (1981)
J Bacteriol 145: 1110-1112.
105. **Mandrard-Berthelot M-A, Wee MYK, Haddock BA** (1978)
FEMS Microbiol Lett 4: 37-40.
106. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J** (1982)
Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring
Habor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
107. **Marmur J** (1961)
J Mol Biol 3: 208-218.
108. **Maxam AM, Gilbert W** (1980)
Methods Enzymol 65: 499-561.
109. **Messing J** (1983)
Methods Enzymol 101: 20-78.
110. **Messing J, Crea R, Seeburg PH** (1981)
Nucleic Acids Res 9: 309-321.
111. **Messing J, Vieira J** (1982)
Gene 19: 269-276.
112. **Miller JB, Amy NK** (1983)
J Bacteriol 155: 793-801.
113. **Miller JH** (1972)
Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
114. **Miller JH, Albertini A** (1983)
J Mol Biol 164: 59-71.

115. **Mizutani T**, Tachibana Y (1986)
FEBS Lett 207: 162-166.
116. **Neidhardt FC**, Bloch PL, Smith DF (1974)
J Bacteriol 109: 736-747.
117. **Neidhardt FC**, Vaughn V, Phillips TA, Bloch PL (1983)
Microbiol Rev 47: 231-284.
118. **Norrander J**, Kempe T, Messing J (1983)
Gene 26: 101-106.
119. **O'Connor MBI**, Malamy MH (1983)
J Bacteriol 156: 669-679.
120. **Ohta A**, Obara T, Asami Y, Shibuya I (1985)
J Bacteriol 163: 506-514.
121. **Ohtsubo H**, Ohtsubo E (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 615-619.
122. **Pascal M-C**, Burini JF, Ratouchniak J, Chippaux M
(1982)
Mol Gen Genet 188: 103-106.
123. **Pascal M-C**, Casse F, Chippaux M, Lepelletier M (1975)
Mol Gen Genet 141: 173-179.
124. **Pascal M-C**, Chippaux M, Abou-Jaoude A, Blaschkowski
HP, Knappe J (1981)
J Gen Microbiol 124: 35-42.
125. **Pecher A**, Zinoni F, Böck A (1985)
Arch Microbiol 141: 359-363.
126. **Pecher A**, Zinoni F, Jatisatienr C, Wirth R, Hennecke
H, Böck A (1983)
Arch Microbiol 136: 131-136.
127. **Peck HD**, Gest H (1957)
J Bacteriol 73: 706-721.
128. **Peden KWC** (1983)
Gene 22: 277-280.
129. **Pelham H** (1985)
Trends Genet 1: 6.
130. **Pichinoty F** (1969)
Ann Inst Pasteur 117: 3-15.
131. **Pinsent J** (1954)
Biochem J 57: 10-16.

132. **Prestidge** LS, Pardee AB (1965)
Biochim Biophys Acta 100: 591-593.
133. **Rosenberg** M, Court D (1979)
Annu Rev Genet 13: 319-353.
134. **Raftery** LA, Egan JB, Cline SW, Yarus M (1984)
J Bacteriol 158: 849-859.
135. **Ruiz-Herrera** J, Alvarez A (1972)
Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 38: 479-491.
136. **Ruiz-Herrera** J, Alvarez A, Figueroa I (1972)
Biochim Biophys Acta 289: 254-261.
137. **Ruiz-Herrera** J, DeMoss JA (1969)
J Bacteriol 99: 720-729.
138. **Ruiz-Herrera** J, Showe MK, DeMoss JA (1969)
J Bacteriol 97: 1291-1297.
139. **Saito** H, Miura K-I (1963)
Biochim Biophys Acta 72: 619-629.
140. **Sancar** A, Hack AM, Rupp WD (1979)
J Bacteriol 137: 692-693.
141. **Sancar** A, Wharton RP, Seltzer S, Kacinski BM, Clarke ND, Rupp WD (1981)
J Mol Biol 148: 45-62.
142. **Sanderson** KE (1976)
Annu Rev Microbiol 30: 327-349.
143. **Sanger** F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB (1982)
J Mol Biol 162: 729-773.
144. **Sankar** P, Lee JH, Shanmugam KT (1985)
J Bacteriol 162: 353-360.
145. **Sawers** RG, Ballantine SP, Boxer DH (1985)
J Bacteriol 164: 1324-1331.
146. **Schauer** NL, Ferry JG (1986)
J Bacteriol 165: 405-411.
147. **Schleif** RF, Wensink PC (1981)
Practical Methods in Molecular Biology. Springer Verlag, Heidelberg.

148. **Schmid G, Böck A (1984)**
System Appl Microbiol 5: 1-10.
149. **Schmidt C, Schmieger H (1984)**
Mol Gen Genet 196: 123-128.
150. **Schrauzer GN (1983)**
Selen: Neuere Entwicklungen aus der Biologie, Biochemie und Medizin. Verlag für Medizin, Dr. Ewald Fischer, Heidelberg.
151. **Schrenk WJ, Weisberg RA (1975)**
Mol Gen Genet 137: 101-107.
152. **Schwarz K, Foltz CM (1957)**
J Am Chem Soc 79: 3292-3293.
153. **Selzer G, Som T, Itoh T, Tomizawa J-I (1983)**
Cell 32: 119-129.
154. **Shamberger RJ (1984)**
in: Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements. Earl Frieden (ed.).
Plenum Press, NY, pp. 201-237.
155. **Shaw DJ, Guest JR (1982)**
J Gen Microbiol 128: 2221-2228.
156. **Shine J, Dalgarno L (1974)**
Proc Natl Acad Sci USA 71: 1342-1346.
157. **Shuber AP, Orr EC, Recny MA, Schendel PF, May HD, Schauer NL, Ferry JG (1986)**
J Biol Chem 261: 12942-12947.
158. **Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW (1984)**
Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
159. **Smith MW, Neidhardt FC (1983)**
J Bacteriol 156: 81-88.
160. **Soberon X, Covarrubias L, Bolivar F (1980)**
Gene 9: 287-305.
161. **Southern EM (1975)**
J Mol Biol 98: 503-517.
162. **Stadtman TC (1979)**
Adv Enzymol 48: 1-28.
163. **Stadtman TC (1980)**
Annu Rev Biochem 49: 93-110.

164. **Stewart V**, MacGregor CH (1982)
J Bacteriol 151: 788-799.
165. **Stormo GD**, Schneider TD, Gold LM (1982)
Nucleic Acids Res 10: 2971-2995.
166. **Studier FW**, Moffatt BA (1986)
J Mol Biol 189: 113-130.
167. **Suggs SV**, Hirose T, Miyake T, Kawashima EH, Johnson MJ, Itakura K, Wallace RB (1981)
Developmental Biology Using Purified Genes. Brown D (ed). Academic Press, NY.
168. **Sunde RA**, Evenson JK (1987)
J Biol Chem 262: 933-937.
169. **Sunde RA**, Hoekstra WG (1980)
Biochem Biophys Res Comm 93: 1181-1188.
170. **Sutcliffe JG** (1979)
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 43: 77-90.
171. **Tabor S**, Richardson CC (1985)
Proc Natl Acad Sci USA 82: 1074-1078.
172. **Terriere C**, Giordano G, Medani C-L, Boxer DH, Haddock BA, Azoulay E (1981)
FEMS Microbiol Lett 11: 287-293.
173. **Tsuchiya T**, Ottina K, Moriyama Y, Newman MJ, Wilson TH (1982)
J Biol Chem 257: 5125-5128.
174. **Tuve T**, Williams HH (1961)
J Biol Chem 236: 597-601.
175. **Varenne S**, Casse F, Chippaux M, Pascal M-C (1975)
Mol Gen Genet 141: 181-184.
176. **Vieira J**, Messing J (1982)
Gene 19: 259-268.
177. **Wallace BJ**, Young IG (1977)
Biochim Biophys Acta 461: 84-100.
178. **Waugh R**, Boxer DH (1986)
Biochimie 68: 157-166.
179. **Wimpenny JWT** (1969)
Biotechnol Bioeng 11: 623-629.

180. **Wimpenny** JWT, Cole JA (1967)
Biochim Biophys Acta 148: 233-242.
181. **Wirth** R (1980)
Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie,
Universität Regensburg.
182. **Wittwer** AJ (1983)
J Biol Chem 258: 8637-8641.
183. **Wittwer** AJ, Stadtman TC (1986)
Arch Biochem Biophys 248: 540-550.
184. **Wittwer** AJ, Tsai L, Ching W-M, Stadtman TC (1984)
Biochemistry 23: 4650-4655.
185. **Wu** LF, Mandrand-Berthelot M-A (1986)
Biochimie 68: 167-179.
186. **Wu** LF, Mandrand-Berthelot M-A (1986)
FEMS Microbiol Lett 34: 323-327.
187. **Wu** TT (1966)
Genetics 54: 405-410.
188. **Yamamoto** F, Muto A, Kawauchi Y, Iwami M, Iwagami S,
Azumi Y, Osawa S (1985)
Proc Natl Acad Sci USA 82: 2306-2309.
189. **Yanisch-Perron** C, Vieira J, Messing J (1985)
Gene 33: 103-119.
190. **Yousaf** SI, Carroll AR, Clarke BE (1984)
Gene 27: 309-313.
191. **Zinoni** F (1983)
Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie,
Universität München.
192. **Zinoni** F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A (1986)
Proc Natl Acad Sci USA 83: 4650-4654.
193. **Zoller** MJ, Smith M (1983)
Methods Enzymol 100: 468-500.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. A. Böck, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für seine hilfreichen Anregungen, seine Bereitschaft zu intensiver Diskussion und seine äußerst großzügige Unterstützung.

Allen meinen Kollegen im Institut und besonders in der "anaeroben" Arbeitsgruppe, A. Birkmann, W. Leinfelder, G. Sawers, K. Forchhammer und R. Böhm, möchte ich für zahlreiche Hinweise und die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. H.-J. Fritz und seiner Arbeitsgruppe, sowie Herrn Dr. T. Dingermann und Frau K. Nerke danke ich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen und die intensive Unterstützung bei der Durchführung der Mutageneseexperimente.

Ich möchte mich auch bei den Herrn Drs. Buckel, Mertz und Schumacher für die freundliche Überlassung von Oligonucleotiden und Antikörpern herzlich bedanken.

Frau Margit Geier danke ich ebenso herzlich für die sorgfältige Reinschrift dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Name: Franz Josef Zinoni

Geburtsdatum, Geburtsort: 03.06.1956, München

Eltern: Franz Xaver Zinoni,
Spenglermeister;
Maria Zinoni, Sekretärin

Ausbildung:

1962 - 1967 Grundschohule in München

1967 - 1975 Erasmus-Grasser-Gymnasium
(math.-naturwissenschaftlich)
in München; Abitur

1975 - 1976 Wehrdienst

1977 - 1983 Studium der Biologie in München
an der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität; Diplom

1983 - 1987 Bearbeitung der vorliegenden
Dissertation am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität
München unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. A. Böck

